



ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΘΕΜΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η επίδραση του ζιζανιοκτόνου nicosulfuron στην κοινότητα των νιτρωδοποιητικών αρχαίων και βακτηρίων του εδάφους

ΛΑΡΙΣΑ 2013

Επιμέλεια:
Αστέρης Θεμιστοκλής

**DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
UNIVERSITY OF THESSALY**

**The impact of herbicide nicosulfuron on the soil nitrifying
communities of Archaea and Bacteria**

LARISSA 2013

Asteris Themistoklis

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- **ΚΑΡΠΟΥΖΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ**

Επίκουρος καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας
του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- **ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ ΚΑΛΛΙΟΠΗ**

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών του τμήματος Βιοχημείας
& Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- **ΜΟΣΣΙΑΛΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ**

Επίκουρος Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων του τμήματος Βιοχημείας
& Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας και Φυτών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επίκουρο καθηγητή Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, κ. Δημήτριο Καρπούζα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε στην ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος και την καθοδήγηση του σε όλα τα στάδια της εκπόνησης της εργασίας.

Επίσης ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην υποψήφια διδάκτορα κ. Παπαδοπούλου Ευαγγελία για τη συνεχή καθοδήγηση, τις πολύτιμες συμβουλές της καθώς και τον άρτιο προγραμματισμό καθ' όλη τη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων.

Ακόμα, ευχαριστώ θερμά όλα τα μέλη του εργαστηρίου για το όμορφο κλίμα συνεργασίας κι επικοινωνίας που δημιούργησαν εντός κι εκτός του χώρου του εργαστηρίου.

Τέλος, δε θα μπορούσα μην ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την υλική και ηθική υποστήριξη όλο το διάστημα της προπτυχιακής ακαδημαϊκής μου ζωής καθώς και την προσπάθεια για τον καλύτερο δυνατό προγραμματισμό μου, καθώς και την κ. Παναγιώτα Καπουλέα για την ψυχολογική υποστήριξη και την ευχάριστη πίεση που μου άσκησε.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	7
1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	8
1.1. Εντατικοποίηση γεωργίας	9
1.2. Γεωργικά Φάρμακα	10
1.3. Ζιζανιοκτόνα	11
1.4. Nicosulfuron	13
1.5. Συμπεριφορά και τύχη ζιζανιοκτόνων στο έδαφος	14
1.6. Επίδραση ζιζανιοκτόνων στους μικροοργανισμούς του εδάφους	16
1.7. Κύκλος Αζώτου	17
1.8. Νιτροποιητικοί οργανισμοί	20
1.8.1. Νιτροδωποιητικά Βακτήρια	21
1.8.2. Νιτροδωποιητικά Αρχαία	24
1.9. Βακτήρια του φύλου <i>Planctomycetes</i>	26
1.10. Σκοπός Εργασίας	27
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	28
2.1. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)	32
2.1.1. Αρχή της μεθόδου	32
2.1.2. Στάδια της αντίδρασης	32
2.1.3. Συστατικά της αντίδρασης	33
2.1.4. Πρωτόκολλο της μεθόδου	34
2.1.4.1. PCR ενίσχυση του <i>amoA</i> γονιδίου των AOA	34
2.1.4.2. PCR ενίσχυση του γονιδίου <i>16S rRNA</i> των AOB	35
2.2. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πηκτή αгарόζης	38
2.2.1. Αρχή της Μεθόδου	38
2.2.2. Συστατικά της Αντίδρασης	41
2.2.3. Περιγραφή της Διαδικασίας	41
2.3. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμίδης με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών	43
2.3.1. Αρχή της Μεθόδου	43
2.3.2. Αντιδραστήρια και εξοπλισμός για την μέθοδο DGGE	44
2.3.3. Στάδια της διαδικασίας	45
2.3.4. Περιγραφή της διαδικασίας	45
2.3.4.1. Ανάλυση της κοινότητας των AOA με την μέθοδο DGGE	47
2.3.4.2. Ανάλυση της κοινότητας των AOB με την μέθοδο DGGE	48
2.4. Στατιστική Ανάλυση	49
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	51
3.1. PCR ενίσχυση του <i>amoA</i> γονιδίου των AOA	52

3.2. PCR ενίσχυση του <i>16S rRNA</i> γονιδίου των ΑΟΒ	52
3.3. Μοριακή αποτύπωση της κοινότητας των ΑΟΑ	53
3.4. Μοριακή αποτύπωση της κοινότητας των ΑΟΒ	58
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	63
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	66

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο γεωχημικός κύκλος του αζώτου αποτελείται από όλες εκείνες τις διαδικασίες που είναι υπεύθυνες για την μετακίνηση του αζώτου στο περιβάλλον και τη μετατροπή του σε λειτουργικά μόρια. Η νιτροποίηση καθιστά σημαντική διαδικασία για την ολοκλήρωση του κύκλου του N και επιτυγχάνεται με τη μεσολάβηση των νιτροδοποιητικών αρχαίων (AOA) και βακτηρίων (AOB) του εδάφους, που συμμετέχουν στη ρυθμό-καθοριστικό πρώτο στάδιο της αντίδρασης της οξειδωσης της αμμωνίας. Παρά τη μεγάλη σημασία των μικροοργανισμών αυτών για τη λειτουργία του εδαφικού οικοσυστήματος, μόλις μικρός αριθμός μελετών έχει ασχοληθεί μέχρι σήμερα με τις επιδράσεις των γεωργικών φαρμάκων στις λειτουργικές κοινότητες των AOB και AOA του εδάφους. Στην παρούσα μελέτη εκτιμήθηκε η επίδραση του ζιζανιοκτόνου nicosulfuron, της ομάδας των σουλφονυλουριών, στη δομή των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών (AOM) του εδάφους. Το nicosulfuron χρησιμοποιείται ευρέως για την αντιμετώπιση ετήσιων και πολυετών αγρωστωδών και πλατύφυλλων ζιζανίων κυρίως σε καλλιέργειες αραβόσιτου, αλλά και σε πλήθος άλλων καλλιεργειών και χαρακτηρίζεται από υψηλή βιοχημική δραστηριότητα και εκλεκτικότητα, σε χαμηλές δόσεις εφαρμογής.

Στα πλαίσια αυτής της μελέτης, χορηγήθηκε nicosulfuron σε δόσεις 0X, 1X και 5X της συνιστώμενης για εφαρμογή σε καλλιέργεια αραβοσίτου σε αγρό και αναλύθηκαν εδαφικά δείγματα που συλλέχθηκαν αμέσως πριν την επέμβαση και σε χρονικά διαστήματα 2, 28 και 116 ημερών μετά την επέμβαση. Για τον προσδιορισμό της επίδρασης του nicosulfuron στη δομή των AOB και AOA, πραγματοποιήθηκε ενίσχυση με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) του *16S rRNA* και του *amoA* γονιδίου, για τα AOB και AOA αντίστοιχα, και ακολούθησε ανάλυση με βαθμίδωση συγκέντρωσης αποδιατακτικών ουσιών σε πηκτή ακρυλαμίδης (DGGE).

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων προέκυψε ότι η σύσταση των εδαφικών κοινοτήτων των AOB και AOA στην περίπτωση του πειράματος αγρού δεν επηρεάστηκε από την επέμβαση με το nicosulfuron σε καμία από τις εξεταζόμενες δόσεις.

ABSTRACT

The geochemical Nitrogen cycle consists of all that processes that are in charge of transforming nitrogen to a more suitable form in order to be assimilated by living organisms. Nitrification is a very important procedure and the rate-limiting step of nitrogen cycle, as it is the process during which ammonia is oxidized to nitrite first and then to nitrate. The first step of nitrification is completed by nitrifying microorganisms such as ammonia-oxidizing Archaea (AOA) and ammonia-oxidizing Bacteria (AOB). Despite the great meaning of these organisms in the soil's functionalism, just a few studies have focused on the impact of pesticides on the soil communities of AOA and AOB. In this study the effect of herbicide nicosulfuron, member of the sulfonylurea family, was tested on the structure of soil ammonia-oxidizing microorganisms. Nicosulfuron is widely used herbicide that controls a wide range of weeds covering not only annual but also perennial species. Particularly, nicosulfuron provides so-called inter genera selectivity between maize and closely related grass weeds. Nicosulfuron is a highly active and selective herbicide even when it is applied in low doses.

In this study, different doses (0X, 1X, 5X of proposed dose) of nicosulfuron were applied in a field cultured with maize, and soil samples were taken before, 2 days, 28 days and 116 days after the appliance of nicosulfuron. For the determination of the impact of nicosulfuron on AOB and AOA communities, genes *16S rRNA* and *amoA* were first amplified with PCR reaction for AOB and AOA respectively, and then the products of PCR were run and analyzed with Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE).

Results revealed that the constitution of AOA and AOB communities in soil was not affected by nicosulfuron not even after the appliance of 5-fold overdose of nicosulfuron.

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1.Εντατικοποίηση γεωργίας

Από αρχαιοτάτων χρόνων, η γεωργία αποτελούσε αναπόσπαστο κομμάτι στη ζωή του ανθρώπου, όταν έπαψε να είναι κυνηγός και συλλέκτης και άρχισε να οργανώνεται σε κοινωνίες. Ως γεωργική δραστηριότητα χαρακτηρίζεται οποιαδήποτε ενέργεια σχετίζεται με την καλλιέργεια της γης και του εδάφους αποσκοπώντας στην παραγωγή φυτικών προϊόντων. Πέρα από την κάλυψη των διατροφικών αναγκών, η γεωργία συνιστά και βασικό παράγοντα και της οικονομίας. Γι αυτό το λόγο, σε συνδυασμό με την ταυτόχρονη αύξηση του πληθυσμού, κατ' επέκταση και των επιθυμιών και των αναγκών της κοινωνίας, συνεχώς γίνονται προσπάθειες εντατικοποίησης, αύξησης και βελτίωσης της γεωργικής παραγωγής.

Η αύξηση της παραγωγής επιτυγχάνεται με τη βελτίωση του εδάφους, τη δημιουργία ποικιλιών που αντέχουν περισσότερο στο υπάρχον έδαφος και κλίμα, τη βελτίωση της συγκομιδής και την προστασία των καλλιεργειών από διάφορα παράσιτα. Στους τρόπους βελτίωσης του εδάφους συμπεριλαμβάνονται η κατάλληλη άρδευση και το όργωμα της γης καθώς και ο εμπλουτισμός του εδάφους με θρεπτικά μέσω φυσικών ή χημικών λιπασμάτων, ενώ οι καλλιεργείες προστατεύονται με τη χορήγηση γεωργικών φαρμάκων και παρασιτοκτόνων.

Ωστόσο, πολλές φορές, η συνεχής και αλόγιστη χρήση γεωργικών φαρμάκων και λιπασμάτων μπορεί να οδηγήσει σε ανεπιθύμητες επιδράσεις στο περιβάλλον. Ήδη από τον Δεύτερο Παγκόσμιο Πόλεμο, οι χρήσεις λιπασμάτων αρχικά, και ζιζανιοκτόνων στη συνέχεια, εντατικοποιήθηκαν με σκοπό την αύξηση της γεωργικής παραγωγής. Το 2001 περίπου 1,14 εκατομμύρια τόνοι ζιζανιοκτόνων χρησιμοποιήθηκαν παγκοσμίως για την καταπολέμηση ζιζανίων σε γεωργικές και μη γεωργικές χρήσεις. Η εκτεταμένη χρήση λιπασμάτων και ζιζανιοκτόνων συνέβαλε σταδιακά στη ρύπανση τόσο του εδάφους όσο και των φυσικών υδάτινων πόρων με άμεσες συνέπειες στην ποικιλότητα και λειτουργία των μικροβιακών κοινοτήτων (Vitousek et al., 1997; Yun-Juan et al., 2001). Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει πως οι δραστηριότητες του ανθρώπου μέσω της συνεχούς απαίτησης για άζωτο στη γεωργία και τη βιομηχανία επηρεάζει τον κύκλο του αζώτου με ταχύτατο ρυθμό (Galloway et al., 2008). Μεγάλη ποσότητα του ανθρωπογενώς χορηγούμενου αζώτου χάνεται στο περιβάλλον προκαλώντας μια σειρά από προβλήματα όπως η αύξηση των νιτρικών στις αποθέματα πόσιμου νερού ή αύξηση του ρυθμού παραγωγής οξειδίων του αζώτου που συμβάλουν στην κλιματική αλλαγή (Duce et al., 2008).

Η γεωργία θεωρείται σε παγκόσμιο επίπεδο μια από τις σημαντικότερες απειλές για την εξαφάνιση απειλούμενων ειδών χλωρίδας και πανίδας (McLaughlin et al., 1995). Κατά τον 20^ο αιώνα, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της βιοποικιλότητας των αγροτικών οικοσυστημάτων σε παγκόσμιο επίπεδο (Noris, 2008).

1.2.Γεωργικά Φάρμακα

Ως γεωργικό φάρμακο ή φυτοπροστατευτική ουσία ορίζεται κάθε ουσία ή μίγμα ουσιών που προορίζεται για την πρόληψη, την καταστροφή ή τον έλεγχο οποιουδήποτε παρασίτου, συμπεριλαμβανομένων φορέων ασθενειών ανθρώπων ή ζώων, ή ανεπιθύμητων φυτικών ή ζωικών ειδών που προκαλούν αλλοίωση στην παραγωγή, στην επεξεργασία, στην αποθήκευση, στην μεταφορά, ή στην εμπορευματοποίηση τροφής, ξύλου και ζωοτροφών (FAO, 2002).

Τα γεωργικά φάρμακα είναι συνήθως χημικές ενώσεις με κύριο συστατικό μία ή περισσότερες δραστικές ουσίες. Μπορούν να χορηγηθούν είτε πριν είτε μετά τη συγκομιδή. Μπορούν να ταξινομηθούν βάση παρασίτου-στόχου (ζιζανιοκτόνα, εντομοκτόνα, μυκητοκτόνα κτλ), χημικής δομής (οργανικό, συνθετικό, βιολογικό κτλ) ή φυσικής κατάστασης (αέριο, υγρό, στερεό). Τα γεωργικά φάρμακα εφαρμόζονται με διάφορους τρόπους, όπως με ψεκασμούς των υπέργειων οργάνων των φυτών, με επένδυση και προστασία των σπόρων ή άλλων πολλαπλασιαστικών οργάνων, μέσω του ποτίσματος της ρίζας δια του συστήματος άρδευσης καθώς και με απευθείας εφαρμογές στο έδαφος.

Τα επίπεδα και η ποιότητα των δραστικών ουσιών που χρησιμοποιούνται στα παρασιτοκτόνα, ρυθμίζονται από την νομοθεσία της κάθε χώρας. Παρόλα αυτά, υπάρχουν διεθνείς οργανισμοί που επιδιώκουν μια κοινή νομοθεσία όσον αφορά τη χρήση γεωργικών φαρμάκων.

Η χρήση γεωργικών φαρμάκων συνέβαλε καθοριστικά στην προστασία της αγροτικής παραγωγής καθώς και στην αύξηση και τη βελτίωση της τροφής παρέχοντας λύση στη συνεχή αύξηση του πληθυσμού. Ταυτόχρονα, η προσφορά τους ήταν μεγάλη στην προστασία της δημόσιας υγείας και στη βελτίωση του βιοτικού επιπέδου με την καταπολέμηση φορέων ασθενειών για τον άνθρωπο. Έρευνες έχουν δείξει πως καλλιέργειες χωρίς τη χρήση γεωργικών φαρμάκων παρουσιάζουν μειωμένη παραγωγικότητα (Saitoh et al., 2001). Επίσης, άμεσες συνέπειες αυτής της κατάστασης είναι η μείωση της τροφής με επακόλουθη αύξηση

τιμών και η απώλεια αρκετών θέσεων εργασίας (Knutson, 1999). Παρόλα αυτά τα τελευταία χρόνια διατυπώνονται ανησυχίες για πιθανές αρνητικές επιδράσεις τους σε οργανισμούς μη-στόχους που διαβιούν στο αγροτικό περιβάλλον ή τρέφονται από τις καλλιέργειες αυτές, την πρόκληση βλαβών στην υγεία του ανθρώπου και στην επιβάρυνση του περιβάλλοντος (Alavanja et al., 2004; Lorenzet al., 2012). Σήμερα όλοι πλέον αναγνωρίζουν τη χρησιμότητά τους στη σύγχρονη γεωργία αλλά και το σημαντικό μερίδιο που κατέχουν στην υποβάθμιση της οικολογικής και χημικής ποιότητας των φυσικών πόρων. Για το λόγο αυτό, κατά τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί ο ρυθμός ανάπτυξης και χρήσης βιολογικής προέλευσης γεωργικών φαρμάκων που θεωρητικά παρουσιάζουν χαμηλές αρνητικές επιδράσεις στο περιβάλλον.

Τα γεωργικά φάρμακα, συνθετικά ή βιολογικής προέλευσης, ανάλογα με τον οργανισμό-στόχο διαχωρίζονται σε πολλές κατηγορίες, οι συνηθέστερες από αυτές:

- Ζιζανιοκτόνα
- Εντομοκτόνα
- Μυκητοκτόνα
- Τρωκτικοκτόνα
- Νηματωδοκτόνα
- Ακαρεοκτόνα

1.3.Ζιζανιοκτόνα

Τα ζιζανιοκτόνα αποτελούν την πιο διαδεδομένη ομάδα γεωργικών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται σήμερα στην αγροτική παραγωγή. Ένα ζιζανιοκτόνο, με την ευρεία του έννοια, είναι η χημική ένωση που είναι ικανή να περιορίσει αποτελεσματικά ή πλήρως την ανάπτυξη φυτών-ζιζανιών που ανταγωνίζονται τα καλλιεργούμενα φυτά. Ως ζιζάνιο χαρακτηρίζεται κάθε ανεπιθύμητο φυτό που αναπτύσσεται σε μια καλλιέργεια χωρίς να έχει σπαρεί.

Το πρώτο εξειδικευμένο ζιζανιοκτόνο που ανακαλύφθηκε ήταν το 2,4-διγλωροφαινοξικό οξύ (συνηθέστερα 2,4-D), το οποίο στοχεύει σε πλατύφυλλα ζιζάνια. Πριν την ανακάλυψη του χρησιμοποιούνται εναλλακτικές τεχνικές, όπως αλλαγές του pH ή της αλατότητας του εδάφους, που δρούσαν με μη εξειδικευμένο τρόπο. Τις τελευταίες δεκαετίες ωστόσο, εξαιτίας της χρησιμότητάς τους, τα

ζιζανιοκτόνα αναπτύσσονται με ταχύτατους ρυθμούς με τη σύνθεση νέων ή βελτίωση παλαιότερων ζιζανιοκτόνων.

Υπάρχουν διάφορα μοντέλα ταξινόμησης και κατηγοριοποίησης των ζιζανιοκτόνων. Η ταξινόμησή τους μπορεί να γίνει βάσει της χημικής δομής και των δραστικών ομάδων που αυτά φέρουν ή του τρόπου και μηχανισμού δράσης τους, ή ακόμη και του τρόπου πρόσληψής τους από το φυτό. Ένας επιπλέον τρόπος κατηγοριοποίησης γίνεται με βάση τον χρόνο εφαρμογής τους σε σχέση με την φύτευση ή φύτευση του καλλιεργούμενου φυτού. Έτσι διακρίνονται σε: 1) προ-φύτευσης, τα οποία εφαρμόζονται στο έδαφος πριν την σπορά της καλλιέργειας, 2) προ-φυτρωτικά, τα οποία εφαρμόζονται στο έδαφος μετά την σπορά και πριν την φύτευση της καλλιέργειας και 3) μετα-φυτρωτικά, τα οποία εφαρμόζονται στο έδαφος ή στο φύλλωμα μετά τη φύτευση της καλλιέργειας. Βάση του τρόπου δράσης τους τα ζιζανιοκτόνα διαχωρίζονται σε επτά κύριες ομάδες ζιζανιοκτόνων: 1) αναστολείς σύνθεσης αμινοξέων, 2) αναστολείς εκβλάστησης σπόρων, 3) ρυθμιστές ανάπτυξης, 4) αναστολείς φωτοσύνθεσης, 5) αναστολείς σύνθεσης λιπιδίων, 6) απορρυθμιστές της κυτταρικής μεμβράνης, 7) αναστολείς φυτικών χρωστικών.

Η δράση ενός ζιζανιοκτόνου μπορεί να είναι εξειδικευμένη (τοξική σε μερικά είδη) ή όχι και να εμφανίζεται μετά από επαφή (δρουν όταν έρχονται σε επαφή με το φύλλωμα των φυτών), ή μετά την μετακίνηση του στο όργανο-στόχο, όταν απορροφάται από το έδαφος ή δια μέσου του φυλλώματος και μετακινείται στα ξυλώδη αγγεία και στο φλοίωμα των φυτών. Αναλόγως της δραστικής ένωσης και του μηχανισμού δράσης του ζιζανιοκτόνου, συναντάται μια μεγάλη ποικιλομορφία του μοριακού μηχανισμού δράσης που στοχεύει σε διαφορετικά ένζυμα, πρωτεΐνες ή βιοχημικά μονοπάτια.

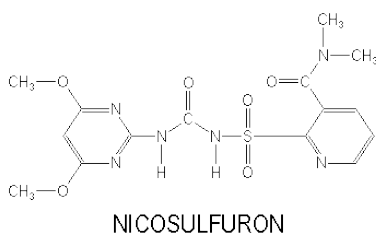
Αν και η χορήγηση ζιζανιοκτόνων προορίζεται για την καταπολέμηση ανεπιθύμητων φυτών, μεγάλες ποσότητες αυτών μπορούν να αποβούν επιζήμιες και να παρουσιάσουν τοξικότητα και σε άλλα είδη ακόμα και στον άνθρωπο (Benachour, 2008).

1.4.Nicosulfuron

Το ζιζανιοκτόνο που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία είναι το nicosulfuron (2-[[[(4,6-dimethoxy-2-pyrimidinyl)amino]carbonyl]sulfonyl]-N,N-dimethyl-3-pyridinecarboxamide), με εμπορική ονομασία στην Ελλάδα Milagro®.

Πρόκειται για ένα γεωργικό φάρμακο, μέλος της ομάδας των σουλφονυλουριών, που χρησιμοποιείται σε καλλιέργειες ρυζιού, αμπελιού, πατάτας, ντομάτας και κυρίως αραβοσίτου (Wu et al., 2010). Είναι διασυστηματικό και μεταφυτρωτικό ζιζανιοκτόνο που προορίζεται για την καταπολέμηση ορισμένων αγρωστωδών και πλατύφυλλων ζιζανίων σε καλλιέργειες αραβοσίτου. Το nicosulfuron δρα παρεμποδίζοντας το ένζυμο ALS (συνθετάση του οξυγαλακτικού οξέος) (Lee et al., 1988; McCourt et al., 2006). Η συνθετάση του οξυγαλακτικού οξέος είναι ένα ένζυμο-κλειδί στο μονοπάτι βιοσύνθεσης αμινοξέων με πλευρική αλυσίδα όπως λευκίνη, ισολευκίνη και βαλίνη (Dailey et al., 1986). Το ζιζανιοκτόνο απορροφάται από τα φύλλα του παρασίτου και κινείται εντός αυτού δια μέσου του ξυλώματος και του φλοιώματος του φυτού. Η εκλεκτικότητα του οφείλεται στην αυξημένη ταχύτητα με την οποία μπορεί το καλλιεργούμενο φυτό να μεταβολίζει και να αποτοξικοποιεί το nicosulfuron σε αντίθεση με τα ζιζάνια-στόχους που αδυνατούν.

Η δραστική ουσία του nicosulfuron είναι μια πυριμιδινυλ-σουλφονυλουρία. Η σύνθεση του εμπορικού σκευάσματος MILAGRO® αποτελείται από nicosulfuron 4% β/ο και 95,52 % β/β βοηθητικές ουσίες.



Εικόνα 1. Χημική δομή του ζιζανιοκτόνου nicosulfuron

Το nicosulfuron εφαρμόζεται με μεταφυτρωτικό ψεκασμό ενώ σύμφωνα με στοιχεία του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων δεν συνιστάται η χορήγηση του συνδυαστικά με κάποιο άλλο γεωργικό φάρμακο.

Πίνακας 1. Χαρακτηριστικά εφαρμογής του nicosulfuron σε καλλιέργεια αραβοσίτου, σύμφωνα με τα στοιχεία αδειοδότησης του προϊόντος από το Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων

Πεδίο Εφαρμογής	Στόχος	Δόσεις Σκευάσματος			Τρόπος και χρόνος εφαρμογής	Μέγιστος αριθμός εφαρμογών ανά καλλιεργητική περίοδο
		Κ. εκ/ στρέμμα	γρ/100 λίτρα ψεκ.υγρού	Όγκος ψεκ. υγρού λίτρα/ στρέμμα		

Αραβόσιτος	Αγρωστώδη ζιζάνια	100	-	20-40	1-3 φύλλα 1-2 αδέλφια	1
	Μουχρίτσα (Echinocholoacrus galli)					
	Σετάριες (Setaria spp)	100			2-4 φύλλα	
	Βέλιουρας (Sorghum halepense)	100			Μέχρι 8 φύλλα 10-20 εκ. ύψος	
	α. Από σπόρο					
	β. Από ρίζωμα					
	Πλατύφυλλα ζιζάνια	100			2-4 φύλλα	
	Βλήτα (Amaranthus spp)					
	Τάτουλας (Datura stramonium)	100-150			2-4 φύλλα	

1.5.Συμπεριφορά και τύχη ζιζανιοκτόνων στο έδαφος

Ένα ζιζανιοκτόνο θεωρείται κατάλληλο για χρήση όταν α) παρουσιάζει εκλεκτικότητα για το καλλιεργούμενο φυτό αλλά είναι αποτελεσματικό εναντίον των ζιζανίων-στόχων, β) δεν παρουσιάζει ιδιαίτερα υψηλή υπολειμματικότητα στο έδαφος περιορίζοντας έτσι την πιθανότητα εμφάνισης φυτοτοξικότητας στην επόμενη καλλιέργεια, γ) δε ρυπαίνει τα επιφανειακά και υπόγεια νερά και δ) δεν εμφανίζει αρνητικές επιδράσεις σε οργανισμούς μη-στόχους. Η τοξικότητα ενός ζιζανιοκτόνου καθορίζεται σε σημαντικό βαθμό από τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες.

Η πιθανότητα εμφάνισης τοξικότητας ενός ζιζανιοκτόνου στο έδαφος εξαρτάται από το σύνολο των διεργασιών που ελέγχουν τη χρονική διάρκεια παραμονής του στο έδαφος (**υπολειμματική διάρκεια**). Γενικότερα όσο μεγαλύτερη υπολειμματική διάρκεια παρουσιάζει ένα ζιζανιοκτόνο τόσο μεγαλύτερος είναι ο κίνδυνος για εμφάνιση τοξικότητας στην επόμενη καλλιέργεια αλλά παράλληλα αυξάνει και ο κίνδυνος εμφάνισης τοξικότητας σε οργανισμούς μη-στόχους καθώς και η

πιθανότητα μετακίνησής του στα υπόγεια και επιφανειακά υδροφόρα συστήματα (Ελευθεροχωρινός, 2008).

Ένα ζιζανιοκτόνο χάνεται από το εδαφικό διάλυμα μέσω διεργασιών φυσικής απομάκρυνσης των μη ιοντιζόμενων μορίων ή ιόντων του (προσρόφηση στα κολλοειδή του εδάφους, έκπλυση, εξάτμιση, απορρόφηση από τα φυτά) ή μέσω διεργασιών αποδόμησης του (φωτοχημική, χημική, μικροβιακή). Με τον όρο **προσρόφηση** εννοείται η προσέλκυση και συγκράτηση των μορίων μιας ουσίας από την επιφάνεια ενός στερεού σώματος, στην περίπτωση του ζιζανιοκτόνου ως στερεό μέσο θεωρούνται τα ανόργανα και οργανικά κολλοειδή του εδάφους. Η προσρόφηση θεωρείται η σημαντικότερη διαδικασία απομάκρυνσης ενός ζιζανιοκτόνου καθώς επηρεάζει τη συγκέντρωση του στο εδαφικό διάλυμα, άρα και τη διαθεσιμότητα και δραστηριότητα του, αλλά και την επακόλουθη κινητικότητα του (έκπλυση, εξάτμιση, διάσπαση). Να σημειωθεί πως ένα ζιζανιοκτόνο είναι ανενεργό όταν βρίσκεται προσροφημένο στα κολλοειδή του εδάφους. Ένας άλλο σημαντικός μηχανισμός απομάκρυνσης ενός ζιζανιοκτόνου είναι η **έκπλυση**, η κάθετη μετακίνηση μιας ουσίας με τη ροή του νερού προς βαθύτερα εδαφικά στρώματα. Η υπερβολική έκπλυση των ζιζανιοκτόνων εγκυμονεί κινδύνους ρύπανσης των υπόγειων υδάτινων πόρων. Η απώλεια των ζιζανιοκτόνων στην ατμόσφαιρα με τη μορφή ατμών συμβαίνει μέσω της **εξάτμισης**. Σημαντικές απώλειες μέσω εξάτμισης συμβαίνουν κυρίως σε ζιζανιοκτόνα που παρουσιάζουν υψηλή τάση ατμών και δη πτητικότητα. Η παραλαβή και απορρόφηση των ζιζανιοκτόνων που βρίσκονται διαλυμένα στο εδαφικό διάλυμα από τα φυτά αποτελεί μια ακόμη διεργασία, βιολογικής σε αυτήν την περίπτωση, απομάκρυνσης τους από το έδαφος. Τα ζιζανιοκτόνα στη συνέχεια εντός των φυτών διασπώνται ενζυμικά και αδρανοποιούνται.

Εκτός από τη φυσική απομάκρυνση ένα ζιζανιοκτόνο μπορεί να διασπαστεί φωτοχημικά, χημικά ή μικροβιακά. Φωτοχημική διάσπαση προκαλείται ύστερα από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (Fenoll et al., 2012). Κατά τη χημική διάσπαση προκύπτει απομάκρυνση του ζιζανιοκτόνου από το έδαφος μέσω αντιδράσεων υδρόλυσης, οξειδωσης ή αναγωγής. Τέλος η μικροβιακή αποδόμηση αποτελεί μια από τις σημαντικότερες διεργασίες απομάκρυνσης των ζιζανιοκτόνων από το περιβάλλον. Αρκετοί μικροοργανισμοί έχουν βρεθεί να διασπούν τα ζιζανιοκτόνα χρησιμοποιώντας τα ως πηγή C και/ή N για την αύξηση και ανάπτυξη τους (Pieper et al., 1988, De Souza et al., 1998, Johannesen et al., 2003, Zhang et al., 2012). Η μικροβιακή αποδόμηση καταλύεται από ένζυμα των μικροοργανισμών τα οποία

μπορεί να δρουν είτε μέσα στα κύτταρα είτε να εκκρίνονται και να δρουν εξωκυτταρικά.

Διάφοροι παράγοντες επηρεάζουν το χρόνο παραμονής ενός ζιζανιοκτόνου στο έδαφος. Από την μία εδαφικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως η μηχανική σύσταση του εδάφους, η θερμοκρασία και η υγρασία του, το pH του, η περιεκτικότητα του σε οργανική ουσία καθώς και η μικροβιακή χλωρίδα καθορίζουν σε σημαντικό βαθμό την υπολειμματικότητα ενός ζιζανιοκτόνου στο έδαφος. Από την άλλη μεριά κλιματικοί παράγοντες όπως το ύψος βροχόπτωσης, η θερμοκρασία και το φως επηρεάζουν με τη σειρά τους το χρόνο παραμονής του ζιζανιοκτόνου στο έδαφος. Τέλος, οι φυσικές και χημικές ιδιότητες της κάθε ουσίας καθώς και ο τρόπος και η συχνότητα εφαρμογής της επηρεάζουν σε σημαντικό βαθμό τον χρόνο παραμονής του ζιζανιοκτόνου στο έδαφος.

1.6.Επίδραση ζιζανιοκτόνων στους μικροοργανισμούς του εδάφους

Οι επιδράσεις των ζιζανιοκτόνων στους μικροοργανισμούς μπορεί να άμεσες (οξεία τοξικότητα) ή έμμεσες (μείωση των πηγών που χρησιμοποιούν για τροφή-ενέργεια). Το αποτέλεσμα αυτών των επιδράσεων είναι η αλλαγή στη σχετική αναλογία των πληθυσμών των μικροοργανισμών και κατ' επέκταση του ρυθμού των βιολογικών διεργασιών στις οποίες συμμετέχουν (κύκλος αζώτου, κύκλος φωσφόρου, αποδόμηση οργανικών ρύπων). Το είδος των μικροοργανισμών, η μείωση του πληθυσμού και η χρονική διάρκεια της αναστολής των βιολογικών διεργασιών που συμμετέχουν εξαρτώνται από το είδος και τη δόση του ζιζανιοκτόνου που εφαρμόζεται. Οι παραπάνω βιολογικές διεργασίες συμβάλλουν στη διατήρηση της γονιμότητας του εδάφους και οι δυσμενείς επιδράσεις των γεωργικών φαρμάκων σε αυτές μπορούν να προκαλέσουν σημαντική μείωση της παραγωγικότητας του εδαφικού οικοσυστήματος (Ingram et al., 2005; Niewiadomska, 2004; Wang et al., 2006). Το ποσοστό των γεωργικών φαρμάκων που καταλήγει στον οργανισμό-στόχο είναι περίπου 0,1% της εφαρμοζόμενης ποσότητας, ενώ η υπόλοιπη ποσότητα καταλήγει συνήθως εκτός στόχου και κυρίως στο έδαφος με αποτέλεσμα τη σημαντική επιβάρυνση του (Carriger et al, 2006; Primentel,1995).

Πολλές έρευνες έχουν γίνει για την επίδραση των ζιζανιοκτόνων στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους με αντικρουόμενα αποτελέσματα . Ο Zhang και οι συνεργάτες μελέτησαν την επίδραση του ζιζανιοκτόνου acetochlor ενός ζιζανιοκτόνου που

χορηγείται σε καλλιέργειες καλαμποκιού, στις κοινότητες των νιτρωδοποιητικών βακτηρίων του εδάφους. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως μακροχρόνια εφαρμογή του ζιζανιοκτόνου σε υψηλές συγκεντρώσεις επηρεάζει την κοινότητα των νιτρωδοποιητικών βακτηρίων (Zhang et al., 2008). Σε άλλη έρευνα, εξετάστηκε η επίδραση μίγματος πέντε ζιζανιοκτόνων (atrazine, dicamba, fluometuron, metolachlor και sulfentrazone) στην κοινότητα των νιτρωδοποιητικών βακτηρίων, και φάνηκε ότι η εφαρμογή χαμηλών συγκεντρώσεων των ζιζανιοκτόνων προκάλεσαν αύξηση του πληθυσμού των νιτρωδοποιητικών βακτηρίων, ενώ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις ο πληθυσμός τους έπεσε κάτω του ορίου ανίχνευσης (Chang et al., 2001). Το ζιζανιοκτόνο mesotrione φάνηκε να επηρεάζει την μικροβιακή κοινότητα του εδάφους και ειδικότερα τους νιτρωδοποιητικούς μικροοργανισμούς, αλλά αυτές οι αλλαγές ανιχνεύονταν μόνο στα εδάφη που δέχτηκαν εφαρμογή υψηλών δόσεων του γεωργικού φαρμάκου, πολύ υψηλότερες από τις συνιστώμενες (Crouzet et al., 2010). Αν και ορισμένα γεωργικά φάρμακα εμφανίζουν τοξικότητα έναντι ορισμένων ομάδων μικροοργανισμών, για άλλες ομάδες είναι πιθανό να αποτελούν πηγή ενέργειας για την αύξηση και ανάπτυξη τους (Johnsen et al., 2001). Έτσι οι επιδράσεις των γεωργικών φαρμάκων στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους δεν μπορούν να προβλεφθούν με ευκολία καθώς πλήθος παραγόντων καθορίζει το τελικό αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης μεταξύ μικροοργανισμών και γεωργικών φαρμάκων.

1.7.Κύκλος Αζώτου

Το άζωτο είναι το πιο άφθονο χημικό στοιχείο του ατμοσφαιρικού αέρα, αποτελώντας το 78% του συνολικού του όγκου και αποτελεί ένα από τα βασικότερα στοιχεία για την αύξηση και ανάπτυξη όλων των ζωντανών οργανισμών, καθώς αποτελεί σημαντικότατο δομικό συστατικό των νουκλεοτιδίων και των αμινοξέων, άρα κατ' επέκταση του γενετικού υλικού και των πρωτεϊνών.

Παρά την αφθονία του αζώτου στη βιόσφαιρα, η πλειονότητα των οργανισμών δε μπορεί να το αξιοποιήσει άμεσα στη μοριακή του μορφή, κι έτσι απαιτείται η μετατροπή του σε πιο εύκολα αφομοιώσιμη μορφή. Οι ανώτεροι οργανισμοί μπορούν να προσλάβουν ανηγμένες μορφές του αζώτου. Η πρόσληψη του αζώτου από την ατμόσφαιρα προϋποθέτει τη διάσπαση ενός εξαιρετικά σταθερού τριπλού

ομοιοπολικού δεσμού ανάμεσα στα δύο άτομα αζώτου, για να παραχθεί αμμωνία ή νιτρικό οξύ.

Η αφομοίωση θρεπτικών ουσιών, όπως του αζώτου, απαιτούν μια σειρά βιοχημικών αντιδράσεων, οι οποίες βρίσκονται ανάμεσα στις πιο ενεργοβόρες για τους ζωντανούς οργανισμούς. Ο κύκλος του N και οι μετατροπές που αυτό υφίσταται στο περιβάλλον, οφείλονται σε μεγάλο ποσοστό σε βιοτικές διεργασίες. Οι βασικότερες από τις οποίες είναι:

- Αζωτοδέσμευση
- Αμμωνιοποίηση
- Νιτροποίηση
- Απονιτροποίηση

Αυτή η διαδικασία είναι κρίσιμη για την διατήρηση της βιολογικής παραγωγικότητας σε ένα οικοσύστημα, καθώς αναπληρώνει και ανακυκλώνει τα ποσά αζώτου που δεσμεύονται από τους οργανισμούς, ή που χάνονται μέσω της απονιτροποίησης ή της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας (Carone & Knapp, 2007).

Αζωτοδέσμευση ονομάζεται η διαδικασία καθήλωσης του ατμοσφαιρικού N_2 από μικροοργανισμούς και αυτό επιτυγχάνεται μέσω της μετατροπής του σε αμμωνία ή νιτρώδη. Η αμμωνία και τα νιτρικά ιόντα που σχηματίστηκαν με αυτόν τον τρόπο καταλήγουν στο έδαφος απ' όπου στη συνέχεια προσλαμβάνονται από τις ρίζες των φυτών. Η αναγωγή του ατμοσφαιρικού αζώτου είναι μια αρκετά πολύπλοκη διαδικασία που απαιτεί μεγάλα ποσά ενέργειας για να ολοκληρωθεί (Postgate, 1982). Η μικροβιακή αζωτοδέσμευση πραγματοποιείται από ορισμένα είδη βακτηρίων, που έχουν την ικανότητα να μετατρέπουν το ατμοσφαιρικό άζωτο σε αμμωνία χρησιμοποιώντας το ένζυμο νιτρογενάση.

Τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια μπορεί να διαβιούν είτε ελεύθερα στο έδαφος όπως βακτήρια του γένους *Azotobacter* είτε στη ριζόσφαιρα φυτών όπως βακτήρια του γένους *Azospirillum*, ή τέλος, να αναπτύσσονται συμβιωτικά σε φυτά-ξενιστές, με αντιπροσωπευτικότερα είδη τα βακτήρια του γένους *Rhizobium* ή του γένους *Bradyrhizobium*, τα οποία σχηματίζουν συμβιωτικά φυμάτια στις ρίζες ψυχανθών.

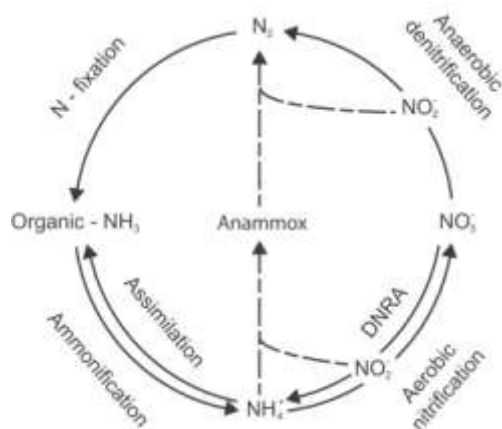
Η **αμμωνιοποίηση** αφορά τη μετατροπή του οργανικού αζώτου σε αμμωνία. Πρόκειται για τη διαδικασία ανακύκλωσης του αζώτου που είχε ήδη δεσμευτεί και απελευθερώνεται στο έδαφος μετά την αποικοδόμηση είτε ζωικών περιττωμάτων είτε νεκρής οργανικής ύλης. Η διαδικασία διάσπασης των μεγαλομοριακών ενώσεων

πραγματοποιείται με τη συμμετοχή μικροοργανισμών όπως τα βακτήρια *Azotobacter*, τα οποία συνθέτουν ειδικά πρωτεολυτικά ένζυμα. Η αποδόμηση πραγματοποιείται εντός των βακτηριακών κυττάρων, όπου το άζωτο μετατρέπεται σε αμμωνία που μεταφέρεται στο έδαφος.

Η αντίστροφη διαδικασία, η μετατροπή, δηλαδή, της αμμωνίας σε νιτρώδη αρχικά και νιτρικά ιόντα στη συνέχεια ονομάζεται **νιτροποίηση**. Το πρώτο βήμα μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε από αερόβια νιτρωδοποιητικά Βακτήρια (AOB) είτε από νιτρωδοποιητικά Αρχαία (AOA), όπως διαπιστώθηκε τα τελευταία χρόνια (Koenneke et al., 2005). Τα νιτρώδη που σχηματίζονται, λόγω της έντονης τοξικότητάς τους για τα βακτηριακά κύτταρα, οξειδώνονται άμεσα προς νιτρικά από νιτριοποιητικά βακτήρια (NOB) με πιο αντιπροσωπευτικά βακτήρια τους γένους *Nitrobacter*. Τα φυτά προσλαμβάνουν το απαιτούμενο άζωτο υπό τη μορφή νιτρικών τα οποία στη συνέχεια τα ανάγουν σε αμμωνία και το ενσωματώνουν σε αμινοξέα και πρωτεΐνες. Τα νιτρικά ιόντα που δεν απορροφώνται από τις ρίζες, λόγω του αρνητικού φορτίου τους και δεν προσδένονται στα εδαφικά κolloειδή με αποτέλεσμα να εκπλένονται εύκολα προς τα υπόγεια υδροφόρα συστήματα που τις περισσότερες φορές χρησιμοποιούνται κυρίως ως πηγές πόσιμου νερού.

Ακολούθως της νιτροποίησης συμβαίνει η **απονιτροποίηση**. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται υπό αναερόβιες συνθήκες και περιλαμβάνει την μετατροπή των νιτρικών σε μοριακό άζωτο μέσω της ενδιάμεσης παραγωγής διαφόρων οξειδίων του αζώτου όπως μονοξείδιο (NO) και υποξείδιο (N_2O).

Εκτός από την αερόβια οξείδωση της αμμωνίας, έχει περιγραφεί και η αναερόβια οξείδωσή της αμμωνίας (**Anammox**, ANaerobic AMMonium OXidation) (Jetten, 2001). Τα βακτήρια που πραγματοποιούν αυτή τη διεργασία ανήκουν στο φύλο Planctomycetes και μετατρέπουν τα νιτρώδη ιόντα και την αμμωνία άμεσα σε N_2 .



Εικόνα 2.Κύκλος αζώτου (Nitrogen Fixation: Αζωτοδέσμευση, Ammonification: Αμμωνιοποίηση, Nitrification: Νιτροποίηση, Denitrification: Απονιτροποίηση, Anammox: Αναερόβια οξείδωση αμμωνίας, DNRA: αναγωγή του νιτρικού σε αμμωνία)

Πηγή: *Appl. Environ. Microbiol.* November 2003 vol. 69 no. 11 6447-6454

1.8. Νιτρωδοποιητικοί μικροοργανισμοί

Περίπου το 25% της ετήσιας ποσότητας αζώτου που παραλαμβάνουν τα αγροτικά οικοσυστήματα βρίσκεται στη μορφή της αμμωνίας (Gruber and Galloway, 2008). Αυτό σημαίνει πως η αμμωνία πρέπει να οξειδωθεί προς σχηματισμό νιτρικών, μια διαδικασία που ολοκληρώνεται από τους νιτροποιητικούς μικροοργανισμούς κατά τη διαδικασία της νιτροποίησης. Η νιτροποίηση είναι μια διαδικασία που ολοκληρώνεται σε δύο βήματα, αρχικά σχηματίζονται νιτρώδη τα οποία στη συνέχεια οξειδώνονται και παράγονται νιτρικά. Το κάθε βήμα διενεργείται από διαφορετική ομάδα μικροοργανισμών καθώς μέχρι σήμερα δεν έχει ταυτοποιηθεί κάποιος οργανισμός που να μπορεί να οξειδώσει πλήρως την αμμωνία προς νιτρικά. Έτσι, οι οργανισμοί που μετατρέπουν την αμμωνία σε νιτρώδη καλούνται νιτρωδοποιητές, ενώ αυτοί που οξειδώνουν τα νιτρώδη σε νιτρικά, νιτριοποιητές.

Αρχικά, και για μεγάλο διάστημα θεωρούνταν πως η οξείδωση της αμμωνίας στο έδαφος γινόταν αποκλειστικά από βακτήρια και ειδικότερα β-*Proteobacteria* που ανήκουν στα γένη *Nitrosomonas* και *Nitrospira* (Kowalchuk and Stephen, 2001). Ωστόσο, στη συνέχεια αποδείχτηκε ότι εκτός από τα βακτήρια και τα αρχαία συμμετέχουν έχουν την ικανότητα να οξειδώνουν την αμμωνία τόσο σε υδάτινα όσο και σε εδαφικά ενδιαιτήματα (Koenneke et al., 2005; Treusch et al., 2005). Έτσι αποδείχθηκε πως εκτός από τα νιτρωδοποιητικά Βακτήρια (AOB) και τα νιτρωδοποιητικά Αρχαία (AOA) συμβάλουν καθοριστικά στον κύκλο του αζώτου. Παρ' όλα αυτά η κατανομή των AOA και AOB στο έδαφος και η συνεισφορά της κάθε ομάδας μικροοργανισμών στην οξείδωση της αμμωνίας δεν είναι πλήρως κατανοητή ακόμη και επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες με καθοριστικότερους το pH, την συγκέντρωση και την μορφή του αμμωνιακού αζώτου (Jia and Conrad, 2009; Offre et al., 2009; Zhang et al., 2010).

Επιπλέον, εκτός από τα AOB και AOA, βακτήρια του φύλου Planctomycetes είναι υπεύθυνα για την αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας και έχουν μελετηθεί σε υδάτινα (Penton et al., 2006) και εδαφικά οικοσυστήματα (Wickramasinghe et al., 2009).

Η οξείδωση της αμμωνίας αποτελεί ορόσημο για την διαδικασία της νιτροποίησης καθώς αυτό το βήμα καθορίζει το ρυθμό με τον οποίο τα αμμωνιακά ιόντα θα οξειδωθούν τελικά σε νιτρικά (Koops et al., 2006). Για το λόγο αυτό η μελέτη για τη συμπεριφορά των AOB και των AOA του εδάφους είναι απαραίτητη. Φυλογενετικές αναλύσεις των νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών έχουν στηριχτεί στα γονίδια 16S

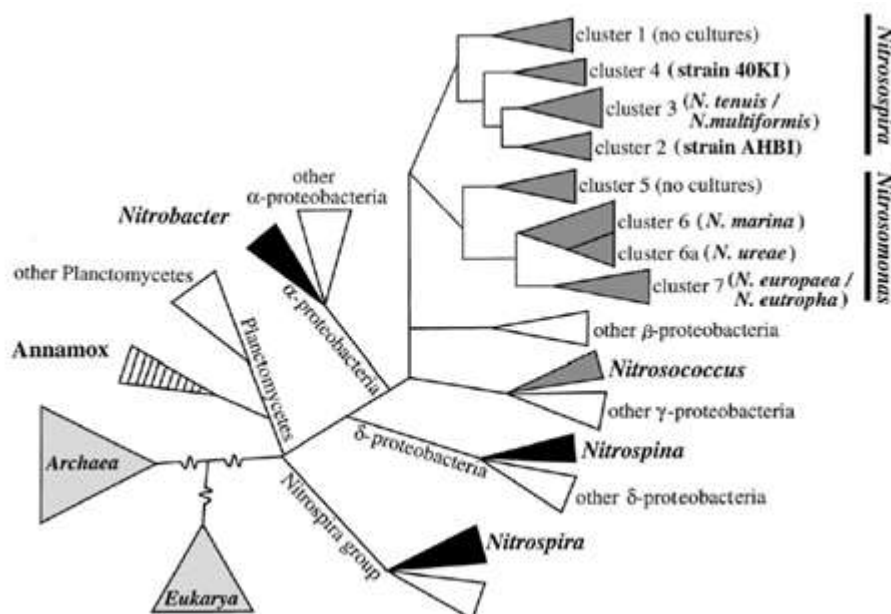
rRNA και στο γονίδιο της A υπομονάδας της μονοοξυγενάσης της αμμωνίας (*amoA*), ενός γονιδίου που συναντάται μόνο στους νιτροδοποιητές ενώ διερευνώνται και άλλοι μοριακοί δείκτες (Junier et al., 2010).

1.8.1. Νιτροδοποιητικά Βακτήρια (Ammonia-oxidizing bacteria, AOB)

Η οξείδωση της αμμωνίας σε νιτρώδη είναι μια διαδικασία δύο βημάτων που καταλύεται από δύο διαφορετικά ενζυμικά σύμπλοκα. Στο πρώτο βήμα η αμμωνία οξειδώνεται σε υδροξυλαμίνη ($\text{NH}_3 + 2\text{e}^- + \text{O}_2 + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$) από το ένζυμο μονοοξυγενάση της αμμωνίας (AMO, Ammonia Mono Oxygenase) (Hooper et al., 1997). Στο δεύτερο βήμα, η υδροξυλαμίνη οξειδώνεται από το ένζυμο οξειδοαναγωγή της υδροξυλαμίνης (HAO) ($\text{NH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NO}_2^- + 4\text{e}^- + 5\text{H}^+$) (Sayavedra-Soto et al., 1994). Η οξείδωση της αμμωνίας πραγματοποιείται από αερόβια αυτότροφα χημειολιθότροφα αρνητικά κατά Gram βακτήρια. Ως χημειολιθότροφα χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας ανόργανους δότες ηλεκτρονίων και συγκεκριμένα οξειδώνουν ανηγμένες ενώσεις αζώτου. Πειράματα έχουν δείξει πως αναστολή της νιτροποίησης οδηγούσε σε ανικανότητα αφομοίωσης του CO_2 από τους μικροοργανισμούς (Pratscher et al., 2011; Xia et al., 2011). Συνήθως τα βακτήρια που συμμετέχουν στο πρώτο στάδιο της νιτροποίησης εντάσσονται σε γένη που φέρουν το πρόθεμα *Nitroso-* με αντιπροσωπευτικά τα γένη *Nitrosomonas* και *Nitrospira*.

Με την ανάπτυξη μοριακών τεχνικών, όπως την αλληλούχιση γονιδίων και γονιδιωμάτων και τη σύγκριση οργανισμών χωρίς να απαιτείται η καλλιέργεια τους έγινε δυνατή η κατανόηση των εξελικτικών σχέσεων των νιτροδοποιητικών βακτηρίων (Arp et al., 2007; Klotz and Stein, 2008). Η ενίσχυση και ανάλυση του γονιδίου 16S rRNA χρησιμοποιήθηκε και για τη μελέτη της ποικιλότητας των AOB (Kowalchuk and Stephen, 2001; Bothe et al., 2000; Juretschko et al., 1998; McCaig et al., 1994; Voytek and Ward 1995). Σύμφωνα με τις αλληλουχίες των 16S rRNA γονιδίων τα AOB χωρίζονται σε δύο μονοφυλετικές γενεαλογικές γραμμές (Head et al., 1993; Purkhold et al., 2003; Teske et al., 1994). Η πρώτη γενεαλογική γραμμή ανήκει στα β -Proteobacteria και αποτελείται από βακτήρια του γένους *Nitrosomonas* (συμπεριλαμβανομένου του *Nitrosococcus mobilis*) και του γένους *Nitrospira* (συμπεριλαμβανομένου των *Nitrosolobus* και *Nitrosovibrio*). Τα μέλη της δεύτερης γενεαλογικής γραμμής εντοπίζονται μόνο σε υδάτινα οικοσύστημα και ανήκουν στα

γ-Proteobacteria. Μέλη αυτής της κατηγορίας είναι τα είδη *Nitrosococcus oceanii* και *Nitrosococcus halophilus* (Ward and O'Mullan 2002). Τα AOB που ανήκουν στα β-Proteobacteria έχουν καταταχθεί σε επτά συστάδες (clusters) με βάση φυλογενετικές αναλύσεις του 16S rRNA γονιδίου αλλά και οικοφυσιολογικά χαρακτηριστικά τους (Εικόνα 4.) (Kowalchuk and Stephen, 2001).



Εικόνα 3. Φυλογενετικό δέντρο βασισμένο σε 16S rRNA αλληλουχίες των διαφόρων οργανισμών που συμμετέχουν στην νιτροποίηση. Τα αερόβια βακτήρια που οξειδώνουν την αμμωνία φαίνονται με σκούρο γκρι, τα βακτήρια που οξειδώνουν τα νιτρώδη με μαύρο και τα αναερόβια βακτήρια με γραμμές. Τα αρχαία που οξειδώνουν την αμμωνία δεν δείχνονται

Βασικό μειονέκτημα για τη χρήση του 16S rRNA ως γονιδίου-δείκτη για την ταξινόμηση των νιτροδοποιητών είναι ότι το συγκεκριμένο γονίδιο δεν σχετίζεται απαραίτητα με τη φυσιολογία και την λειτουργία των μικροοργανισμών (Kowalchuk and Stephen 2001) και μια μικρή έλλειψη εξειδίκευσης μπορεί να μετατοπίσει το φάσμα των αλληλουχιών που ενισχύονται με την PCR προς φυλογενετικά συγγενικούς αλλά φυσιολογικά διαφορετικούς οργανισμούς (Bothe et al., 2000; Junier et al., 2008). Επίσης, κάποιες μικροβιακές ομάδες δεν είναι αριθμητικά κυρίαρχες, όπως συμβαίνει στην περίπτωση των μικροοργανισμών που οξειδώνουν την αμμωνία, και αρκετές είναι δύσκολο να ανιχνευθούν μέσω του 16S rRNA γονιδίου.

Μια εναλλακτική προσέγγιση για τις οικολογικές μελέτες αποτελούν άλλοι μοριακοί δείκτες που σχετίζονται με την λειτουργία ενός οργανισμού όπως είναι τα γονίδια που εμπλέκονται σε συγκεκριμένα μεταβολικά μονοπάτια π.χ. οξείδωση αμμωνίας. Η αμμωνία αρχικά οξειδώνεται από το ένζυμο μονοοξυγενάση της

αμμωνίας (AMO) σε υδροξυλαμίνη. Το ένζυμο AMO κωδικοποιείται από τα γονίδια *amoA*, *amoB* και *amoC* που βρίσκονται σε ένα οπερόνιο με τη δομή *amoCAB*. Υπάρχουν πολλαπλά αντίγραφα του οπερονίου *amoCAB* στο γονιδίωμα των AOB που ανήκουν στα β-Proteobacteria (Chain et al., 2003; Norton et al., 2008; Stein et al., 2007), ενώ ένα αντίγραφο στο γονιδίωμα των AOB που ανήκουν στα γ-Proteobacteria (Klotz et al., 2006). Από τα παραπάνω γονίδια μόνο το *amoA* χρησιμοποιείται ως μοριακός δείκτης για τη μελέτη της ποικιλότητας των AOB. Αυτό το τμήμα είναι σχετικά μικρό σε μέγεθος (450 bp), σχετικά συντηρημένο και πλεονεκτεί έναντι του 16S rRNA γονιδίου λόγω της υψηλότερης εξειδίκευσής του.

Τα νιτροδοποιητικά βακτήρια απαντούν ευρύτατα στο έδαφος και στο νερό. Όσον αφορά το έδαφος έχει αποδειχθεί ότι η οξείδωση της αμμωνίας σπάνια συμβαίνει σε τιμές pH κάτω από 7 (Burton and Prosser 2001; Gieseke et al., 2006). Ωστόσο, έχουν παρατηρηθεί ομάδες AOB σε εδάφη με pH μεταξύ 4,5 και 7,5 (Nicol et al., 2008).

Η μελέτη των AOB στα θαλάσσια οικοσυστήματα με τη χρήση των γονιδίων 16S rRNA και *amoA* έδειξαν ότι οι μικροοργανισμοί αυτοί είναι διαδεδομένοι σε παράκτιες περιοχές, ωκεανούς ακόμα και σε πολικά περιβάλλοντα (Hollibaugh et al., 2002; O'Mullan and Ward 2005). Επίσης άλλες μελέτες εξέτασαν την νιτροποίηση σε υψηλές θερμοκρασίες και περιέγραψαν μια κοινότητα με κυρίαρχες τις αλληλουχίες του γένους *Nitrosospira* (Lebedeva et al., 2005). Η εύρεση *amoA* αλληλουχιών σε όξινες θερμές πηγές σε ορυχείο χρυσού αποκάλυψε την μεγάλη προσαρμοστικότητα συγκεκριμένων AOB σε ακραία περιβάλλοντα (Hirayama et al., 2005).

Γενικά, οι μεγαλύτεροι αριθμοί AOB εντοπίζονται σε ενδιαιτήματα πλούσια σε αμμωνία όπως περιοχές αποσύνθεσης πρωτεϊνών και σε εγκαταστάσεις βιολογικού καθαρισμού λυμάτων. Επίσης, νιτροδοποιητικά βακτήρια αναπτύσσονται καλά σε λίμνες και υδάτινα ρεύματα που δέχονται νερά υπονόμων και άλλα λύματα διότι αυτά συνήθως είναι πλούσια σε αμμωνία.

1.8.2. Νιτροδοποιητικά Αρχαία (Ammonia-oxidizing archaea. AOA)

Από τότε που απομονώθηκαν νιτροδοποιητικοί μικροοργανισμοί στα τέλη του 19^{ου} αιώνα, θεωρούνταν πως όλοι οι αυτότροφοι μικροοργανισμοί ικανοί να οξειδώσουν την αμμωνία ήταν βακτήρια. Ωστόσο, μετά από μεταγονιδιωματικές αναλύσεις φάνηκε πως και τα Αρχαία, και συγκεκριμένα το φύλο των Κρεναρχαιωτικών, εκφράζουν το γονίδιο της μονοοξυγενάσης της αμμωνίας (AMO)

(Koenneke et al., 2005). Από τότε καινούρια στοιχεία συνεχώς προκύπτουν που αποδεικνύουν τη συμμετοχή των Αρχαίων στην αερόβια οξείδωση της αμμωνίας. Πλέον είναι παραδεκτό πως τα νιτρώδοποιητικά Αρχαία (AOA) εντοπίζονται σε όλα τα περιβάλλοντα και επίσης μπορούν να εντοπιστούν ακόμα και σε ακραία περιβάλλοντα όπως θερμές πηγές. Μοριακές αναλύσεις έχουν δείξει πως τα AOA είναι από τους πιο άφθονους νιτρώδοποιητές του πλανήτη, ενώ σε αρκετές περιπτώσεις ξεπερνούν και τον αριθμό των AOB (Schleper and Nicol, 2010).

Αρχικώς, υπερίσχυε η άποψη πως στα Αρχαία κατατάσσονται οργανισμοί που ευδοκούν μόνο σε ακραία περιβάλλοντα στα οποία δεν μπορούσαν να επιβιώσουν άλλα είδη όπως υπέρθερμες χερσαίες πηγές, λίμνες με υψηλή αλατότητα, βάθη ωκεανών (Woese, 1987). Στη συνέχεια όμως αυτή η άποψη απορρίφθηκε καθώς με μελέτες που δεν απαιτούσαν καλλιέργεια οργανισμών, στηριζόμενες στην ενίσχυση 16S rRNA αλληλουχιών από περιβαλλοντικά δείγματα διαπιστώθηκε πως Αρχαία μπορούν να εντοπιστούν σε όλα τα οικοσυστήματα (DeLong, 1998; Schleper et al., 2005). Η ύπαρξη των Αρχαίων σε διάφορα ενδιαίτηματα όπως εδάφος, στο πλαγκτόν ωκεανών, σε θαλάσσια και εδαφικά ιζήματα παρουσιάστηκε σε μια μεγάλη πληθώρα ερευνών.

Μόλις τα τελευταία χρόνια αποδείχθηκε η συμβολή των AOA στην νιτροποίηση, και γενικότερα στον κύκλο του αζώτου, όταν βρέθηκαν Αρχαία που κωδικοποιούσαν τα γονίδια *amoA* και *amoB* καθώς και αλληλουχίες παρόμοιες με την νιτρική αναγωγή (Treusch et al., 2005). Επίσης στη συναρμολόγηση γονιδιώματος Αρχαίων θαλάσσιας προέλευσης, βρέθηκαν αλληλουχίες που κωδικοποιούσαν το *amoC* (Venter et al., 2004; Nicol and Schleper, 2006). Βρέθηκε επίσης πως το οπερόνιο των Αρχαίων σε αντίθεση με αυτό των AOB ήταν της μορφής *amoBCA*. Επίσης, μικρή ομολογία βρέθηκε όσον αφορά την αμινοξική αλληλουχία του ενζύμου AMO των AOA και των AOB. Ωστόσο, επώαση Αρχαίων απομονομένων από έδαφος και συγκεκριμένα του στελέχους *Nitrosopumilus maritimus*, με NH_4^+ , έδειξε σημαντική αύξηση της έκφρασης των *amo*-like γονιδίων αποδεικνύοντας έτσι πως όντως τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν το ένζυμο AMO (Treusch et al., 2005; Koenneke et al., 2005). Αν και χημειολιθοτροφικά AOA είναι συνήθως δύσκολο να αναπτυχθούν και να καλλιεργηθούν σε εργαστηριακές συνθήκες, πρόσφατα, αναφέρθηκε η καλλιέργεια άλλων δύο θερμοφίλων αρχαίων, του *Candidatus Nitrosocaldus yellowstonii* (de la Torre et al., 2008) και του *Candidatus Nitrososphaera gargensis* (Hatzenpichler et al., 2008) από θερμοπηγές.

Η ταξινόμηση των AOA στηριζόμενη στην αλληλουχία 16S rRNA, αρχικά έδειχνε μεγάλη ομολογία με το φύλο των Κρεναρχαιωτικών, γι αυτό τα AOA πάντα κατατάσσονταν σε αυτό το φύλο σε όλες τις μελέτες που στηρίζονταν σε αναλύσεις του γονιδίου 16S rRNA (DeLong, 1992). Ωστόσο, χρησιμοποιώντας τα δεδομένα από 53 ριβοσωμικές πρωτεΐνες που συναντώνται στα Αρχαία και στα Ευκάρυα, ο Brochier-Armanet και οι συνεργάτες (2008), υπολόγισαν πως κάποια «ενδιάμεσα Κρεναρχαιωτικά» αποτελούν καινούριο φύλο που ονομάστηκε *Thaumarchaeota* και το οποίο ξεχωρίζει από τα φύλα των Κρεναρχαιωτικών και Ευρυαρχαιωτικών. Γενωμικές αναλύσεις των *N. maritimus* *N.* και *N. gargensis* επιβεβαίωσαν τον παραπάνω διαχωρισμό των AOA (Spang et al., 2010).

Μετά την διαπίστωση ύπαρξης του γονιδίου *amo* τα AOA έχουν εντοπιστεί τόσο σε χερσαία όσο και σε υδάτινα περιβάλλοντα. Μια σειρά από κατάλληλους εκκινητές σχεδιάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν σε πολλές έρευνες που περιέλαμβαναν ανάλυση περιβαλλοντικών δειγμάτων ως προς την ανίχνευση AOA. Βρέθηκε πως τα AOA εντοπίζονται στα περισσότερα αν όχι σε όλα τα περιβάλλοντα, στοιχεία που συμφωνούν και με αναλύσεις που στηρίζονται στο γονίδιο *16S rRNA* (Schleper and Nicol, 2010). Έτσι, τα *Thaumarchaeota* έχουν βρεθεί σε χερσαία οικοσυστήματα (Ochsenreiter et al., 2003). Η άποψη της σημαντικότητας των AOA στο έδαφος ενισχύεται από μελέτες που έχουν δείξει πως τα *Thaumarchaeota* αποτελούν τη βασική γενεαλογική γραμμή στα περισσότερα εδάφη (Auguet et al., 2010). Επίσης, μια πληθώρα μελετών έχει δείξει την υπεροχή των AOA έναντι των AOB σε διάφορα εδάφη (Leininger et al., 2006; He et al., 2007, Di et al., 2010).

Και σε θαλάσσια και υδάτινα οικοσυστήματα έχει μελετηθεί και βρεθεί πως ο αριθμός του *amoA* των AOA είναι μέχρι και τρεις τάξεις μεγέθους υψηλότερος από τον αντίστοιχο των AOB (Ingalls et al., 2006; Wuchter et al., 2006). Επίσης, AOA έχουν ανιχνευθεί και σε εκβολές ποταμών (Caffrey et al., 2007). Τέλος, AOA έχουν ανιχνευθεί και σε ακραία περιβάλλοντα με υψηλές θερμοκρασίες όπως είναι θερμοπηγές (Reigstad et al., 2008) αλλά και σε περιβάλλοντα όπου επικρατούν ακραίες χαμηλές θερμοκρασίες όπως είναι ορεινές λίμνες (Jiang et al., 2009) και νερά ωκεανών σε μεγάλα βάθη (Tamegai et al., 2007). Επιπλέον, αν και αρκετές μοριακές μελέτες εστιάζουν στα AOA, λίγα είναι γνωστά για τις μεταβολικές στους συνθήκες καθώς φαίνεται πως ο μηχανισμός οξείδωσης της αμμωνίας αλλά και αφομοίωσης του άνθρακα διαφέρει μεταξύ AOB και AOA (Hatzenpichler, 2012; Nicole and Prosser, 2011).

1.9. Βακτήρια του φύλου *Planctomycetes* (ANAMMOX)

Η μελέτη και ταξινόμηση των αναερόβιων βακτηρίων που οξειδώνουν την αμμωνία έχει βασιστεί στο γονιδιακό τόπο 16S rRNA. Όπως και στα AOB, η ανάλυση των αλληλουχιών του 16S rRNA γονιδίου των αναερόβιων βακτηρίων δείχνει ότι δημιουργούν ένα μονοφυλετικό κλάδο μέσα στο φύλο *Planctomycetes*. Αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας έχει παρατηρηθεί τόσο σε υδάτινα (Penton et al., 2006) όσο και σε χερσαία οικοσυστήματα (Wickramasinghe et al., 2009).

1.10. Σκοπός Εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης του ζιζανιοκτόνου nicosulfuron στις κοινότητες των νιτρωδοποιητικών αρχαίων και βακτηρίων του εδάφους. Οι πιθανές επιδράσεις μελετήθηκαν ως προς τον χρόνο μετά την εφαρμογή. Η διαδικασία περιλάμβανε την εκχύλιση DNA από το έδαφος, την ενίσχυση συγκεκριμένων γονιδίων-δεικτών για τους νιτρωδοποιητικούς μικροοργανισμούς (*amoA* και *16S rRNA*), την ποιοτική ανάλυση των μεταβολών των κοινοτήτων των μικροοργανισμών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών (DGGE), και τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων με τεχνικές πολυμεταβλητότητας.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Το πείραμα διεξάχθηκε σε αγροτεμάχιο της περιοχής Rimski Sancevi (19° 51,321 to 45° 19,928), στο Novi Sad της Σερβίας από την ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου Μικροβιολογίας του University of Novi Sad στα πλαίσια του ερευνητικού έργου ECOFUN-MICROBIODIV που χρηματοδοτήθηκε από την Ευρωπαϊκή Κοινότητα. Ο συγκεκριμένος αγρός βρισκόταν σε καλλιέργεια αραβοσίτου κατά τα τελευταία έτη και οι φυσικοχημικές ιδιότητες του εδάφους παρουσιάζονται στον Πίνακα 2. Στις 28.04.2011, πραγματοποιήθηκε σπορά με φυτά αραβόσιτου (*Zea mays* L., υβρίδιο NSSC 640), σε σύστημα με σειρές με αποστάσεις σποράς 25 cm στην γραμμή και 75 cm μεταξύ των γραμμών (Εικόνα 4). Ακολούθως, το πειραματικό αγροτεμάχιο χωρίστηκε με πλήρως τυχαιοποιημένο σχέδιο (random block design) σε 16 πειραματικά τεμάχια, διαστάσεων 6m πλάτος x 5m μήκος (4 επαναλήψεις ανά μεταχείριση). Όταν τα φυτά του αραβόσιτου βρίσκονταν στο στάδιο ανάπτυξης των 6-8 φύλλων (04.06.2011), πραγματοποιήθηκε επέμβαση, με το ζιζανιοκτόνο nicosulfuron (Accent 75DF) σε δόσεις 0x, 1x, 2x και 5x της συνιστώμενης (0 g ha⁻¹, 60 g ha⁻¹, 120 g ha⁻¹, 300 g ha⁻¹, αντίστοιχα). Η εφαρμογή του ζιζανιοκτόνου σε όλες τις περιπτώσεις πραγματοποιήθηκε με ψεκαστήρα πλάτης (Εικόνα 5). Τα εναπομείναντα τέσσερα πειραματικά τεμάχια δέχτηκαν την ίδια ποσότητα νερού χωρίς nicosulfuron και χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Πριν την εφαρμογή του nicosulfuron και σε χρόνους 2, 28 και 116 ημέρες αργότερα δείγματα εδάφους συλλέχθηκαν από κάθε πειραματικό τεμάχιο και αποθηκεύτηκαν στους -20°C. Σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας από κάθε πειραματικό τεμάχιο συλλέχθηκαν 5 δείγματα επιφανειακού εδάφους (0-20 cm) τα οποία αναμίχθηκαν επιμελώς ώστε να προκύψει ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα ανά μεταχείριση και χρόνο δειγματοληψίας. Ακολούθως όλα τα δείγματα απεστάλησαν στον Ερευνητικό Ινστιτούτο INRA, Dijon, Γαλλία όπου και πραγματοποιήθηκε η εξαγωγή DNA σύμφωνα με το πρωτόκολλο ISO standard 11063. Ακολούθως το DNA αφού ποσοτικοποιήθηκε φωτομετρικά απεστάλει στο εργαστήριο μας για περαιτέρω προσδιορισμό των επιδράσεων του nicosulfuron στην κοινότητα των AOA και AOB.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλοι εκκινητές για την ενίσχυση (1) του 16S rRNA γονιδίου των AOB και (2) του *amoA* γονιδίου των AOA, ενώ η μελέτη της επίδρασης του nicosulfuron στις μικροβιακές κοινότητες του εδάφους πραγματοποιήθηκε μόνο για τις μεταχειρίσεις 0X, 1X και 5X. Η διαφορετική προσέγγιση στα ενισχυόμενα γονίδια προέκυψε λόγω των δυσκολιών που αντιμετωπίσαμε στην προσπάθεια ενίσχυσης του *amoA* γονιδίου των AOB με τους

εκκινητές amo1f+GC και amo2R. Αντίδραση PCR εσωτερικής ένθεσης χρησιμοποιήθηκε στην περίπτωση ενίσχυσης της 16S rRNA αλληλουχίας των AOB.

Πίνακας 2. Φυτικοχημικές ιδιότητες του εδάφους που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη

Ιδιότητες	Τιμές Εδάφους
pH (σε H ₂ O)	6.96
CaCO ₃ (%)	0.14
Ολικό N (%)	0.192
P ₂ O ₅ (mg/100g)	8.40
K ₂ O (mg/100g)	27.3
Άμμος (%)	36.75
Ιλύς (%)	35.76
Άργιλος (%)	27.49
Μηχανική σύσταση	Άργιλο-πηλώδες



Εικόνα 5. Η σπορά αραβοσίτου και η προετοιμασία του αγρού



Εικόνα 4. Στο στάδιο ανάπτυξης 6-8 φύλλων της καλλιέργειας αραβοσίτου πραγματοποιήθηκε εφαρμογή του nicosulfuron με ψεκαστήρα πλάτης

Προς διευκόλυνση της διεξαγωγής των επόμενων βημάτων της πειραματικής διαδικασίας, τα αρχικά δείγματα αριθμήθηκαν κατά αύξοντα αριθμό όπως αναγράφεται στον Πίνακα 3:

Πίνακας 3. Λίστα δειγμάτων που αναλύθηκαν και η σήμανση τους

A/A	Χειρισμός	Χρόνος
1	Control	Before
2		
3		
4		
5	1X	
6		
7		
8		
9	5X	
10		
11		
12		
13	Control	2 Days
14		
15		
16		
17	1X	
18		
19		
20		
21	5X	
22		
23		
24		
25	Control	28 Days
26		
27		
28		
29	1X	
30		
31		
32		
33	5X	
34		
35		
36		
37	Control	
38		
39		
40		

41	1X	End (112 days)
42		
43		
44		
45	5X	
46		
47		
48		

2.1. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

2.1.1. Αρχή της μεθόδου

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης επινοήθηκε το 1983 από τους Mullis, Faloona και Saiki, ενώ το 1993 απονεμήθηκε στον Mullis το βραβείο Nobel Χημείας (Saiki et al., 1985). Μέχρι και σήμερα αποτελεί ένα από τα βασικότερα εργαλεία της Βιοχημείας και της Μοριακής Βιολογίας καθώς αποτελεί μια τεχνική *in vitro* σύνθεσης DNA. Η μέθοδος βασίζεται σε επαναλαμβανόμενους κύκλους πολλαπλασιασμού της επιλεγμένης αλληλουχίας με τη βοήθεια μίας DNA πολυμεράσης και δύο ειδικών μονόκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων, των εκκινήτων.

2.1.2. Στάδια της αντίδρασης

Κάθε κύκλος πολυμερισμού αποτελείται από τα εξής βήματα:

1. Την αποδιάταξη του DNA στόχου (μήτρα) που πραγματοποιείται συνήθως σε θερμοκρασία 94°C για 30 sec.
2. Την υβριδοποίηση των ειδικών εκκινήτων στο αποδιαταγμένο DNA στόχο. Η θερμοκρασία και ο χρόνος που χρειάζονται για την υβριδοποίηση των εκκινήτων εξαρτάται από τη συγκέντρωση τους στην αντίδραση, το μήκος και την αλληλουχία των βάσεων τους. Η θερμοκρασία της αντίδρασης για την υβριδοποίηση ρυθμίζεται περίπου 5°C χαμηλότερα από το σημείο τήξης (Tm).
3. Την επιμήκυνση από κάθε εκκινήτη μιας συμπληρωματικής αλυσίδας. Ο χρόνος για την επιμήκυνση εξαρτάται από το μήκος και τη συγκέντρωση της αλληλουχίας του στόχου και από τη θερμοκρασία της αντίδρασης. Συνήθως, η επιμήκυνση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 72°C, στην οποία η Taq πολυμεράση προσθέτει 35-100 νουκλεοτίδια ανά δευτερόλεπτο ανάλογα με το

pH, τη συγκέντρωση ιόντων, το ρυθμιστικό διάλυμα και το είδος του υποστρώματος DNA.

2.1.3. Συστατικά της αντίδρασης

Μια αντίδραση PCR πρέπει να περιέχει τα εξής αντιδραστήρια:

1. Τον στόχο (μήτρα) DNA, η ποσότητα του οποίου εξαρτάται από τον αριθμό των αντιγράφων του. Στις βέλτιστες συνθήκες, η τεχνική PCR μπορεί θεωρητικά να ενισχύσει την αλληλουχία στόχο από ένα μόνο αντίγραφο DNA. Ωστόσο για την κάθε αντίδραση απαιτείται συγκεκριμένης ποσότητας και ποιότητας DNA.
2. Την Taq DNA πολυμεράση, η οποία έχει απομονωθεί από το θερμο-ανθεκτικό βακτήριο *Thermus aquaticus* και επιτρέπει τη χρήση υψηλών θερμοκρασιών στα βήματα υβριδισμού και επιμήκυνσης (Saiki et al., 1988).
3. Ένα ζεύγος συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων, τα οποία αποκαλούνται εκκινητές και καθορίζουν τα όρια του τμήματος DNA που θα ενισχυθεί. Τα ολιγονουκλεοτίδια πρέπει να είναι αντιπαράλληλου προσανατολισμού και καθένα συμπληρωματικό προς τη μία αλυσίδα του υπό μελέτη DNA.
4. Ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα της Taq πολυμεράσης, ώστε να διατηρούνται σταθερά το pH και η ιονική ισχύς του περιβάλλοντος της αντίδρασης, τα οποία παρέχονται από την παρουσία Tris-HCl και NaCl ή KCl, αντίστοιχα.
5. Κατάλληλη συγκέντρωση διαλύματος $MgCl_2$. Η παρουσία των Mg^{+2} είναι απαραίτητη για τη δράση της πολυμεράσης. Τα ιόντα σχηματίζουν διαλυτά σύμπλοκα με τα dNTPs ώστε να δημιουργήσουν το πραγματικό υπόστρωμα που αναγνωρίζει η πολυμεράση (Harris & Jones, 1997).
6. Κατάλληλο διάλυμα ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs: dATP, dTTP, dCTP, dGTP) σε συγκέντρωση 0.2 mM το καθένα, ώστε να περιοριστεί η πιθανότητα εισαγωγής λανθασμένου νουκλεοτιδίου

2.1.4. Πρωτόκολλο της μεθόδου

2.4.1.1. PCR ενίσχυση του *amoA* γονιδίου των AOA

Η PCR για την ενίσχυση του γονιδίου *amoA* των AOA ολοκληρώθηκε σε ένα στάδιο καθώς το προϊόν που προκύπτει μπορεί να ηλεκτροφορηθεί απευθείας σε πηκτή ακρυλαμίδης με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών, χωρίς να απαιτείται η μεσολάβηση πρόσθετης αντίδρασης PCR εσωτερικής ένθεσης για την προσθήκη ζευγών γουανίνης-κυτοσίνης στο 5' άκρο (GC-clamp). Όλες οι αντιδράσεις έγιναν σε σωληνάκια τύπου erppendorf σε τελικό όγκο 50 μ l. Το πρωτόκολλο αντίδρασης παρουσιάζεται παρακάτω:

Πίνακας 4. Οι όγκοι και οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR αντίδραση για την ενίσχυση του *amoA* γονιδίου των AOA

Αντιδραστήρια	Όγκοι (μ l)
DNA εδάφους	1
Ρυθμιστικό διάλυμα Πολυμεράσης 10x με $MgCl_2$ (15 mM)	5
dNTPS (10 mM)	1
Εκκινητής A23f (20 pmol/ μ l)	1.25
Εκκινητής A616r (20 pmol/ μ l)	1.25
Kapa Taq πολυμεράση (5 U/ μ l)	0.2
Bovine Serum Albumin (BSA, 10 μ g/ μ l)	2
Αποστειρωμένο ddH ₂ O	38.3
Συνολικός όγκος	50

Το BSA (ορός αλβουμίνης) αποτελεί πρότυπο διάλυμα πρωτεϊνών και χρησιμοποιείται ως σταθεροποιητικός παράγοντας για τη δράση του ενζύμου αναστέλλοντας τη δράση αναστολέων που συνεκχλίζονται μαζί με το DNA του εδάφους που χρησιμοποιείται ως μήτρα στην συγκεκριμένη αντίδραση.

Πίνακας 5. Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR ενίσχυση του γονιδίου *amoA* των ΑΟΑ

Αρχική αποδιάταξη	95°C	5 min	
Αποδιάταξη	94°C	30 sec	10 κύκλους
Υβριδοποίηση	55°C	30 sec	
Επιμήκυνση	72°C	1 min	
Αποδιάταξη	92°C	30 sec	25 κύκλους
Υβριδοποίηση	55°C	30 sec	
Επιμήκυνση	72°C	1 min	
Τελική επιμήκυνση	72°C	10 min	

2.1.4.2. PCR ενίσχυση του γονιδίου *16S rRNA* των ΑΟΒ

Για την ενίσχυση του γονιδίου *16S rRNA* των ΑΟΒ και την παραλαβή κατάλληλου προϊόντος που να μπορεί να αναλυθεί σε σύστημα DGGE πραγματοποιήθηκαν τρεις διαδοχικές PCR αντιδράσεις για κάθε δείγμα. Στην πρώτη PCR αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές *bamof-bamor* που ενισχύουν ένα τμήμα του γονιδίου *16S rRNA* των ΑΟΒ μεγέθους 1100 bp. Οι εκκινητές αυτοί παρουσιάζουν μερικοί εξειδίκευση ως προς την ενίσχυση του γονιδίου *16S rRNA* των ΑΟΒ και έχει βρεθεί ότι ενισχύουν και άλλα συγγενικά γένη βακτηρίων σε μικρό ποσοστό (McCaig et al. 1994). Οι συνθήκες της 1^{ης} αντίδρασης PCR παρουσιάζονται στους Πίνακες 6 και 7. Στη συνέχεια, το προϊόν της πρώτης PCR αντίδρασης υποβλήθηκε σε νέα αντίδραση PCR με χρήση των εκκινητών CTO189fABC και CTO654r, για την ενίσχυση τμήματος της αλληλουχίας του *16S rRNA* των ΑΟΒ. Το συγκεκριμένο ζεύγος εκκινητών παρουσιάζει υψηλή και απόλυτη εξειδίκευση ως προς την ενίσχυση του *16S rRNA* γονιδίου των ΑΟΒ, που ανήκουν στα *β-proteobacteria* και κυριαρχούν στα εδαφικά οικοσυστήματα (Kowalchuk et al., 1997). Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης ήταν 50 μl και το τελικό προϊόν της ενίσχυσης είχε μέγεθος 465 bp (Πίνακας 8 και Πίνακας 9). Τέλος, το προϊόν της 2^{ης} PCR αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε σε 3^η PCR εσωτερικής ένθεσης, αφού πρώτα αραιώθηκε 1:100, με τους εκκινητές 357f+GC και 534r προκειμένου να προκύψει προϊόν κατάλληλο για ανάλυση με τη μέθοδο DGGE. Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης ήταν 25μl και το

τελικό προϊόν είχε μέγεθος 194bp. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε PCR αντίδραση καθώς και οι αντίστοιχες θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες παρουσιάζονται στους Πίνακες 10 και 11.

Πίνακας 6. Οι όγκοι και οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στην αρχική PCR αντίδραση για την ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου των AOB με την χρήση των εκκινητών β-amo-f και β-amo-r

Αντιδραστήρια	Όγκοι (μL)
DNA εδάφους	1
Ρυθμιστικό διάλυμα Πολυμεράσης 10x με MgCl ₂ (15 mM)	2.5
dNTPs (10 mM)	0.5
Εκκινητής β-amo f (20 pmol/μl)	
Εκκινητής β-amo r (20 pmol/μl)	0.5
KapaTaq πολυμεράση (5 U/μl)	0.2
BSA (10 μg/μl)	1
Αποστειρωμένο ddH ₂ O	18.8
Συνολικός όγκος	25

Πίνακας 7. Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR ενίσχυση του γονιδίου 16S rRNA των AOB με τους εκκινητές β-amo-f και β-amo-r

Αρχική αποδιάταξη	94°C	5min	
Αποδιάταξη	94°C	40 sec	30 κύκλους
Υβριδοποίηση	55°C	30 sec	
Επιμήκυνση	72°C	2 min	
Τελική επιμήκυνση	72°C	10 min	

Πίνακας 8. Οι όγκοι και οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στην δεύτερη PCR αντίδραση για την ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου των AOB με την χρήση των εκκινητών CTOs.

Αντιδραστήρια	Όγκοι (μl)
DNA από πρώτη PCR αντίδραση	1 μl
Ρυθμιστικό διάλυμα Πολυμεράσης 10x με MgCl ₂ (15 mM)	5 μl
dNTPs (10 mM)	1 μl
Εκκινητής CTO ABC 189f (20 pmol/μl)	1 μl

Εκκινητής CTO 654r (20 pmol/μl)	1 μl
ΚαραΤaq πολυμεράση (5 U/μl)	0.2 μl
Αποστειρωμένο ddH ₂ O	18.8 μl
Συνολικός όγκος	50 μl

Πίνακας 9. Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR ενίσχυση του γονιδίου 16S rRNA των AOB με τους εκκινητές CTOs.

Αρχική αποδιάταξη	95°C	3 min	
Αποδιάταξη	95°C	1 min	30 κύκλους
Υβριδοποίηση	57°C	1 min	
Επιμήκυνση	72°C	1 min	
Τελική επιμήκυνση	72°C	10 min	

Πίνακας 10. Οι όγκοι και οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στην δεύτερη PCR αντίδραση για την ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου των AOB με την χρήση των εκκινητών 357f + GC και 534r.

Αντιδραστήρια	Όγκοι (μl)
DNA από δεύτερη PCR αντίδραση (1:100 αραίωση)	1 μl
Ρυθμιστικό διάλυμα Πολυμεράσης 10x με MgCl ₂ (15 mM)	2.5 μl
dNTPs (10 mM)	0.25 μl
Εκκινητές 357f GC (20 pmol/μl)	0.25 μl
Εκκινητές 534 r (20 pmol/μl)	0.25 μl
ΚαραΤaq πολυμεράση (5 U/μl)	0.2 μl
Αποστειρωμένο ddH ₂ O	20.3 μl
Συνολικός όγκος	25 μl

Πίνακας 11. Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR ενίσχυση του γονιδίου 16S rRNA των AOB με τους εκκινητές 357f-GC και 534r

Αρχική αποδιάταξη	95°C	5 min	
Αποδιάταξη	95°C	30 sec	25 κύκλους
Υβριδοποίηση	57°C	30 sec	
Επιμήκυνση	72°C	30 sec	
Τελική επιμήκυνση	72°C	10 min	

Οι αλληλουχίες των μορίων των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν σε όλες τις αντιδράσεις PCR τόσο στην ενίσχυση του *amoA* των AOA όσο και του *16S rRNA* των AOB απεικονίζονται στον Πίνακα 12.

Πίνακας 12. Οι αλληλουχίες των εκκινητικών μορίων που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των γονιδίων *amoA* των AOA και *16S rRNA* για AOB

Ομάδα Μικροοργανισμών	Εκκινητής	Αλληλουχία	Πηγή
AOA	A23f	5'-ATGGTCTGGCTWAGACG-3'	Tournai et al., (2008)
	A616r	5'-CCATCCATCTGTATGTCCA-3'	
AOB	β-AMO f	5'-TGGGGRATAACGCAYCGAAAG-3'	McCaig et al. (1994)
	β-AMO r	5'-AGACTCCGATCCGGACTACG-3'	
	CTO189fABC	5'-GGAGRAAAGYAGGGGATCG-3'	Kowalchuk et al., (1997)
	CTO654r	5'-CTAGCYTTGTAGTTTCAAACGC-3'	
	357f+GC	5'- <u>GCCCGCCGCGCGCCGCGGGCGGGGC</u> <u>GGGGGCACGGGGGGCC</u> TACGGGAGGGAGCAG-3'	Muyzer et al. (1993)
	534r	5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'	

2.2. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πηκτική αгарόζης

2.2.1. Αρχή της Μεθόδου

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του DNA μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αгарόζης ενδείκνυται σε περιπτώσεις χαμηλής συγκέντρωσης ή καθαρότητας των προς εξέταση δειγμάτων. Η ποσοτικοποίηση βασίζεται στην ιδιότητα του δίκλωνου DNA να συνδέεται με την ένωση βρωμιούχο αιθίδιο, με τα μόρια της οποίας φωσφορίζουν κάτω από το υπεριώδες φως. Η σύνδεση αυτή και η ένταση φθορισμού είναι ανάλογη της ποσότητας DNA. Η εκτίμηση της συγκέντρωσης γίνεται συγκρίνοντας το φθορισμό που εκπέμπεται από το προς ανάλυση DNA με το φθορισμό γνωστής συγκέντρωσης και μήκους DNA (μάρτυρας-ladder).

Η μέθοδος χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό, την αναγνώριση και τον καθορισμό κομματιών DNA. Βασίζεται στην αρχή της μετανάστευσης φορτισμένων μορίων κάτω από την επίδραση ενός εξωτερικού εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού πεδίου.

Η ηλεκτροστατική δύναμη που αναπτύσσεται κατευθύνει τα αρνητικά φορτισμένα μόρια του DNA προς την άνοδο. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA στα πηκτώματα αгарόζης εξαρτάται από τους εξής παράγοντες:

- Το μέγεθος του DNA. Γραμμικά δίκλωνα DNA κινούνται σε ρυθμό αντιστρόφως ανάλογο του log του μοριακού βάρους.
- Την συγκέντρωση της αгарόζης. Η κινητικότητα ενός κομματιού DNA διαφέρει σε πήκτωμα διαφορετικής συγκέντρωσης αгарόζης. Χρησιμοποιώντας πηκτώματα διαφορετικών συγκεντρώσεων μπορούμε να διαχωρίσουμε ένα μεγάλο εύρος μεγεθών DNA.
- Τη στερεοδιάταξη του DNA. Η κλειστή (υπερελικωμένη) κυκλική μορφή (μορφή I), η ανοιχτή κυκλική μορφή (μορφή II) και το γραμμικό DNA (μορφή III) του ίδιου μοριακού βάρους έχουν διαφορετική κινητικότητα σε πηκτώματα αгарόζης. Οι σχετικές κινητικότητες των τριών μορφών εξαρτώνται κυρίως από τη συγκέντρωση αгарόζης στο πήκτωμα, αλλά επηρεάζονται επίσης από την ένταση του ρεύματος, την ιονική ισχύ του ρυθμιστικού διαλύματος και τον βαθμό υπερελίκωσης της μορφής I του DNA. Κάτω από ορισμένες συνθήκες, η μορφή I κινείται γρηγορότερα από την III. Κάτω από άλλες συνθήκες συμβαίνει το αντίστροφο.
- Την ένταση του ρεύματος. Σε χαμηλή τάση η κινητικότητα των γραμμικών κομματιών DNA είναι ανάλογη με τα volts που χρησιμοποιούνται. Σε υψηλότερη ένταση η κινητικότητα κομματιών DNA μεγάλου μοριακού βάρους αυξάνεται με διαφορετικό συντελεστή σε κάθε κομμάτι DNA.
- Την παρουσία χρωστικών. Όταν αυξάνεται η συγκέντρωση βρωμιούχου αιθιδίου, περισσότερη χρωστική δεσμεύεται στο DNA. Έτσι, αναιρούνται προοδευτικά οι αρνητικές στροφές υπερέλικας της μορφής I και η κινητικότητά της. Στο σημείο συγκέντρωσης ελεύθερου βρωμιούχου αιθιδίου, όταν δεν υπάρχουν πλέον στροφές υπερέλικας, η μορφή I αποκτά την ελάχιστη κινητικότητά της. Αν αυξηθεί ακόμα περισσότερο η συγκέντρωση βρωμιούχου αιθιδίου, δημιουργούνται θετικές στροφές υπερέλικας και η κινητικότητα της μορφής I αυξάνεται γρήγορα. Οι κινητικότητες των μορφών II και III μειώνονται με διαφορετικό βαθμό η καθεμία.
- Τη σύσταση και την ιοντική ισχύς του διαλύματος ηλεκτροφόρησης. Απουσία ιόντων η ηλεκτρική αγωγιμότητα είναι ελάχιστη και το DNA μετακινείται με

πολύ αργό ρυθμό ή καθόλου. Διαλύματα με υψηλό βαθμό ιοντισμού δημιουργούν υψηλή ηλεκτρική αγωγιμότητα που σαν αποτέλεσμα έχει την ανάπτυξη θερμότητας στη συσκευή. Στη χειρότερη περίπτωση, το πήκτωμα λειώνει και το DNA αποδιατάσσεται.

2.2.2. Συστατικά της Αντίδρασης

Για την ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων σε πηκτή αгарόζης χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια:

- Αγαρόζη
- Βρωμιούχο αιθίδιο (10 mg ml^{-1})
- Ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1x: Προέκυψε με αραίωση πυκνού διαλύματος TAE 50x. Για την παρασκευή του TAE 50x, προστέθηκαν σε ογκομετρική φιάλη 500 ml απιονισμένο H_2O , 242 g Tris Base, 57.1ml οξικό οξύ, 18.6 g EDTA και ακολούθησε ανάδευση. Ο τελικός όγκος του διαλύματος προσαρμόστηκε στο 1L με απιονισμένο H_2O και το pH ρυθμίστηκε στην τιμή 8.6 ± 0.2 .
- Ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης 6x (Loading buffer): Για την παρασκευή τελικού όγκου διαλύματος φόρτωσης 10ml, πραγματοποιήθηκε ανάμιξη 5 ml γλυκερόλης, 1 ml Bromophenol blue, 0.5 ml 20x TAE και 3.5 ml d.d. H_2O .
- Μίγμα δεικτών νουκλεοτιδίων γνωστού μεγέθους (Quick-Load® 2-Log DNA Ladder: 0.1-10.0 Kb).

2.2.3. Περιγραφή της Διαδικασίας

1. Ζυγίζεται η επιθυμητή ποσότητα αγαρόζης η οποία αναμιγνύεται με συγκεκριμένο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης συνήθως 1X TAE. Η αγαρόζη διαλύεται με τη βοήθεια βρασμού ώσπου το διάλυμα να γίνει τελείως διαυγές.
2. Στη συνέχεια προστίθεται διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου σε τελική συγκέντρωση.
3. Το διάλυμα εισάγεται σε ένα γυάλινο καλούπι συγκεκριμένων διαστάσεων (μήτρα πολυμερισμού ηλεκτροφορητικής συσκευής) όπου και πολυμερίζεται. Οι θέσεις εισαγωγής των δειγμάτων DNA (πηγάδια) σχηματίζονται με τη

- βοήθεια ειδικής μήτρας που τοποθετείται στη συσκευή (χτενάκια) πριν τον πολυμερισμό του πηκτώματος.
4. Στα δείγματα DNA που πρόκειται να αναλυθούν προστίθεται διάλυμα χρωστικής Loading buffer.
 5. Όταν στερεοποιηθεί το διάλυμα τοποθετείται στην ηλεκτροφορητική συσκευή η οποία είναι πληρωμένη με διάλυμα ηλεκτροφόρησης (αντίστοιχο με αυτό που έχει κατασκευαστεί το πήκτωμα) τόσο ώστε να επικαλύπτει το πήκτωμα.
 6. Τα δείγματα τοποθετούνται στα πηγαδάκια και αναλύονται σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης.
 7. Προκειμένου να είναι δυνατή η εκτίμηση του μεγέθους των τμημάτων DNA που αναλύονται, ηλεκτροφορείται μαζί με τα δείγματα και ο μάρτυρας μοριακών βαρών (ladder).

Ηλεκτροφόρηση προϊόντος ενίσχυσης του γονιδίου *amoA*

Το προϊόν της PCR ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αгарόζης συγκέντρωσης 1.2%. Για την παρασκευή της πηκτής ζυγίστηκε ποσότητα αгарόζης και διαλυτοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1X. Στο μίγμα προστέθηκε και βρωμιούχο αιθίδιο για τη σήμανση του DNA. Για κάθε δείγμα φορτώθηκαν στα κελιά της πηκτής 1 μl loading buffer και 10 μl προϊόντος PCR και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση για 50 min στα 70 V. Ακολούθως τα PCR προϊόντα που προέκυψαν οπτικοποιήθηκαν σε φώς UV και φωτογραφήθηκαν.

Ηλεκτροφόρηση προϊόντων ενίσχυσης του γονιδίου 16S rRNA των AOB

Το προϊόν της 1^{ης} PCR ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αгарόζης συγκέντρωσης 1%. Τα προϊόντα της 2^{ης} PCR και της 3^{ης} PCR εσωτερικής ένθεσης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτές αгарόζης συγκέντρωσης 1.2%. Για την παρασκευή της πηκτής ζυγίστηκε ποσότητα αгарόζης και διαλυτοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1X. Στο μίγμα προστέθηκε και βρωμιούχο αιθίδιο για τη σήμανση του DNA. Για κάθε δείγμα, σε κάθε περίπτωση, φορτώθηκαν στα κελιά της πηκτής 1 μl loading buffer και 10 μl προϊόντος PCR και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση για 50 min στα 70 V. Ακολούθως τα PCR προϊόντα που προέκυψαν οπτικοποιήθηκαν σε φως UV και φωτογραφήθηκαν.

2.3. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμίδης με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών (DGGE)

2.3.1. Αρχή της Μεθόδου

Η DGGE αρχικά περιγράφηκε από τον Muyzer και τους συνεργάτες ως μια τεχνική που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό μορίων DNA του ίδιου μεγέθους που διαφέρουν ακόμα και κατά μια μόνο βάση [8]. Η διαχωριστική ικανότητα της μεθόδου βασίζεται στις συνθήκες αποδιάταξης του δίκλωνου μορίου DNA που επηρεάζονται άμεσα από την θερμοκρασία και τη συγκέντρωση αποδιατακτικών ουσιών. Κάτω από αυξανόμενη συγκέντρωση αποδιατακτικών ουσιών οι συμπληρωματικοί κλώνοι του δίκλωνου θραύσματος DNA αποδιατάσσονται σε διαφορετικό σημείο με αποτέλεσμα να εμφανίζουν διαφορετική κινητικότητα μέσα σε μια πηκτή πολυακρυλαμίδης κατά την ηλεκτροφόρηση τους.

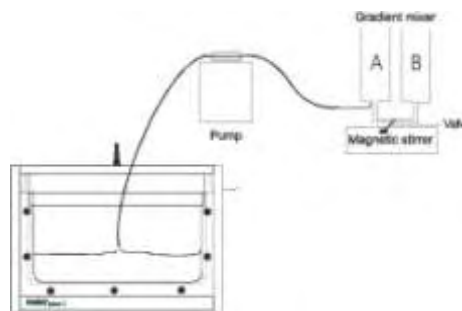
Η μέθοδος DGGE περιλαμβάνει την ηλεκτροφόρηση δίκλωνων τμημάτων DNA (γύρω στα 400-500 ζ.β. για ικανοποιητική ανάλυση) σε πηκτή πολυακρυλαμίδης με γραμμική βαθμίδωση (από πάνω προς το κάτω) χημικών αποδιατακτικών ουσιών. Καθώς το δείγμα εισέρχεται στην περιοχή της πηκτής με τη συγκέντρωση αποδιατακτικού παράγοντα στην οποία το DNA του δείγματος αρχίζει να αποδιατάσσεται, η δίκλωνη αλυσίδα ανοίγει σχηματίζοντας μια διακλαδισμένη δομή η οποία παρουσιάζει διαφορετική κινητικότητα στην πηκτή. Εάν σε ένα δείγμα DNA περιέχονται παραπάνω αλληλουχίες με ίδιο μέγεθος που διαφέρουν και κατά μία βάση, είναι δυνατός ο διαχωρισμός εξαιτίας του διαφορετικού σημείου αποδιάταξης της αλληλουχίας. Για να αποτραπεί η πλήρης αποδιάταξη του δίκλωνου DNA απαιτείται η προσθήκη μιας περιοχής πλούσιας σε GC (GC-clamp, συνήθως μήκους 30-60 ζ.β.) στο 5' άκρο ενός εκ των δύο εκκινητών που χρησιμοποιούνται για την PCR ενίσχυση του γονιδιακού τόπου που πρόκειται να αναλυθεί. Λόγω της ευκολίας που παρέχει η μέθοδος καθώς επιτρέπει την σύγκριση αλληλουχιών άρα και τον εντοπισμό διαφορετικών οργανισμών χωρίς την καλλιέργεια τους, η τεχνική DGGE έχει βρει εφαρμογή σε πολλούς τομείς όπως η κλινική μικροβιολογία, η μικροβιολογία τροφίμων αλλά και η μικροβιακή οικολογία.

2.3.2. Αντιδραστήρια και εξοπλισμός για την μέθοδο DGGE

Ο εξοπλισμός που απαιτείται για την πραγματοποίηση της ηλεκτροφόρησης με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών περιλαμβάνει ένα πλήρες σύστημα ηλεκτροφόρησης της εταιρείας INGENY και αντλία ανάμειξης διαλυμάτων των αποδιατακτικών ουσιών.



Εικόνα 6. Συσκευή INGENYphorU για ανάλυση DGGE



Εικόνα 7. Παρασκευή της πηκτής ακρυλαμίδης με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών με χρήση αντλίας ανάμειξης.

Για την προετοιμασία της πηκτής χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια:

- Ακρυλαμίδα (Acrylamide-Bisacrylamide, 40% solution, 37.5:1, BioRad)
- Φορμαμίδα (Promega)
- Ουρία (Promega)
- N,N,N',N'-tetramethylene diamine (TEMED, BioRad)
- Διάλυμα Ammonium Persulfate (APS) 10% (100mg ml⁻¹ d.d. H₂O) (Sigma, Germany)
- Ρυθμιστικό διάλυμα TAE 50X και 1X

Για τη χρώση της πηκτής απαιτούνται τα παρακάτω αντιδραστήρια:

- 10% απόλυτη αιθανόλη
- 0.5% οξικό οξύ
- Νιτρικός άργυρος (AgNO₃)
- Υδροξείδιο Νατρίου (NaOH)
- Υπερβορικό Νάτριο (NaBH₄)
- Φορμαλδεΰδη

2.3.3. Στάδια της διαδικασίας

Τα στάδια εφαρμογής της μεθόδου DGGE περιγράφονται παρακάτω:

1. Προετοιμασία της κασέτας ηλεκτροφόρησης

Πριν την παρασκευή της πηκτής πολυακρυλαμίδης απαιτείται σωστό στήσιμο της κασέτας ηλεκτροφόρησης. Αυτό περιλαμβάνει και τη συναρμολόγηση της κασέτας ηλεκτροφόρησης με τρόπο που θα επιτρέψει τη σωστή παρασκευή της πηκτής χωρίς την ύπαρξη διαρροών.

2. Προετοιμασία των διαλυμάτων και παρασκευή της πηκτής

Για την προετοιμασία της πηκτής προαπαιτείται η προετοιμασία διαλυμάτων των αποδιατακτικών ουσιών. Αρχικά, παρασκευάζονται τα διαλύματα 0% και 100% των αποδιατακτικών ουσιών, και στη συνέχεια αυτά αναμειγνύονται σε κατάλληλες ποσότητες ώστε να επιτευχθούν τα όρια της βαθμίδωσης. Στα αρχικά διαλύματα περιέχεται και η απαιτούμενη ποσότητα ακρυλαμίδης ώστε να προκύψει κατάλληλης συγκέντρωσης πηκτή ακρυλαμίδης. Μέσω χρήσης αντλίας επιτυγχάνεται η βαθμίδωση των αποδιατακτικών ουσιών στην πηκτή.

3. Ηλεκτροφόρηση της πηκτής

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε κατάλληλη συσκευή που φέρει δεξαμενή με το ρυθμιστικό διάλυμα στην οποία τοποθετείται η κασέτα ηλεκτροφόρησης, και θερμοστάτη για την σωστή ρύθμιση της θερμοκρασίας του διαλύματος. Μετά τη σύνδεση των ηλεκτροδίων, το ρυθμιστικό διάλυμα της δεξαμενής συνεχώς ανακυκλώνεται για όση ώρα διαρκεί η ηλεκτροφόρηση.

4. Χρώση της πηκτής και οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, ακολουθεί η χρώση της πηκτής με κατάλληλα διαλύματα. Με την ολοκλήρωση της χρώσης ακολουθεί φωτογράφιση της πηκτής και περαιτέρω επεξεργασία των δεδομένων με κατάλληλα ψηφιακά και στατιστικά εργαλεία.

2.3.4. Περιγραφή της διαδικασίας

Σε γενικές γραμμές ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία για τη μοριακή αποτύπωση της κοινότητας των AOA και AOB με την μέθοδο DGGE με την βασική διαφορά ότι για την ανάλυση των AOA χρησιμοποιήθηκε πηκτή ακρυλαμίδης 8% με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών 30-50% ενώ αντίστοιχα για τα AOB η βαθμίδωση ήταν 45-

62%. Ως αποδιατακτικές ουσίες χρησιμοποιήθηκαν ουρία και φορμαμίδη. Για την επιτυχή διαμόρφωση της βαθμίδωσης των αποδιατακτικών ουσιών στην πηκτή αρχικά παρασκευάστηκαν διαλύματα αποδιατακτικών ουσιών 0 και 100% όπως φαίνεται στον Πίνακα 13. Με ανάμιξη κατάλληλων ποσοτήτων των παραπάνω δύο διαλυμάτων παρασκευάστηκαν κατάλληλα διαλύματα αποδιατακτικών ουσιών σε συγκεντρώσεις 30 και 50% για τα ΑΟΑ και 45 και 62% για τα ΑΟΒ. Τα διαλύματα αυτά τοποθετήθηκαν στην αντλία ανάμειξης η οποία ακολούθως συνδέθηκε με την κασέτα ηλεκτροφόρησης. Για την στερεοποίηση της πηκτής προστίθενται οι παράγοντες πολυμερισμού APS (ammonium persulfate) και TEMED λίγο πριν την ανάμιξη των διαλυμάτων των αποδιατακτικών ουσιών..

Πίνακας 13. Σύσταση των διαλυμάτων αποδιατακτικών ουσιών 0 και 100% που χρησιμοποιήθηκαν για την προετοιμασία των πηκτών ακρυλαμίδης συγκέντρωσης 8% (οι αριθμοί στην αριστερή πλευρά του πίνακα υποδεικνύουν τη σειρά προσθήκης των αντιδραστηρίων)

	Αντιδραστήρια	0%	100%
1	Ακρυλαμίδη 40%	20 ml	20 ml
3	Φορμαμίδη	-	40 ml
4	Ουρία	-	42 g
2	50X TAE	2 ml	2 ml
5	dH ₂ O (μέχρι όγκου)	100 ml	100 ml

Αμέσως μετά την έκχυση της ακρυλαμίδης στην κασέτα ηλεκτροφόρησης απαιτήθηκε περίπου 1,5 h για τον πλήρη πολυμερισμό της. Στο διάστημα αυτό η δεξαμενή της συσκευής Ingeny έχει πληρωθεί με ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1X η θερμοκρασία του οποίου σταθεροποιήθηκε στους 60°C. Ακολούθως η πηκτή μαζί με την κασέτα ηλεκτροφόρησης τοποθετήθηκαν στο εσωτερικό της δεξαμενής και ακολούθησε φόρτωση των δειγμάτων στα σχηματισμένα πηγάδια της πηκτής. Για κάθε δείγμα φορτώθηκαν 5 μl loading buffer και 1 μl προϊόν της PCR ή 2 μl στην περίπτωση του ladder (ladder προστέθηκε μόνο στην περίπτωση των ΑΟΒ διότι δεν υπήρχε παρασκεύασμα που να μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την περίπτωση των ΑΟΑ). Μετά την φόρτωση των δειγμάτων η συσκευή συνδέθηκε σε εξωτερική πηγή ρεύματος ισχύος 90 mV και η ηλεκτροφόρηση διήρκεσε 16h.

Με την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης η κασέτα ηλεκτροφόρησης απομακρύνθηκε από την δεξαμενή και ακολούθησε χρώση της πηκτής με την μέθοδο

του νιτρικού αργύρου. Έτσι, αρχικά η πηκτή τοποθετήθηκε σε διάλυμα αιθανόλης και οξικού οξέος (διάλυμα πρόσδεσης) για 2 h. Στη συνέχεια η πηκτή ξεπλύθηκε με απιονισμένο νερό και τοποθετήθηκε σε διάλυμα νιτρικού αργύρου (διάλυμα χρώσης) για 30 min. Τέλος, η πηκτή τοποθετήθηκε σε διάλυμα NaBH_4 και φορμαλδεΐδης σε NaOH (διάλυμα εμφάνισης) μέχρι οι ζώνες στην πηκτή ακρυλαμίδης να είναι ευδιάκριτες. Σε όλα τα βήματα της διαδικασίας, το δοχείο με το διάλυμα και την πηκτή βρίσκεται υπό ανάδευση.

A) Διάλυμα Πρόσδεσης (Fixing Solution): αναμίχθηκαν 10 ml καθαρής αιθανόλης 10% και 5 ml οξικού οξέος 0.5%. Συμπληρώνεται απιονισμένο νερό έως το 1L.

B) Διάλυμα Χρώσης (Staining Solution): σε 1L H_2O γίνεται προσθήκη 1 g AgNO_3 .

C) Διάλυμα Εμφάνισης (Developing Solution): αναμιγνύεται 1L NaOH 1.5%, 4 ml φορμαλδεΐδης και 0.1 g NaBH_4 .

2.3.4.1. Ανάλυση της κοινότητας των ΑΟΑ με την μέθοδο DGGE

Για την μοριακή ανάλυση της κοινότητας των ΑΟΑ χρησιμοποιήθηκε πηκτή ακρυλαμίδης 8% με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών 30-50% που παρασκευάστηκαν όπως φαίνεται στο Πίνακα 14. Ο τελικός όγκος των διαλυμάτων ήταν 25 ml.

Πίνακας 14. Οι όγκοι των διαλυμάτων αποδιατακτικών ουσιών που αναμίχθηκαν για την παρασκευή πηκτής για παρασκευή πηκτής ακρυλαμίδης 8% με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών 30 και 50%

Συγκέντρωση Αποδιατακτικών Ουσιών	Διάλυμα 100 % (ml)	Διάλυμα 0% (ml)
30%	7.5	17.5
50%	12.5	12.5

Για κάθε πηκτή παρασκευάστηκαν τα παρακάτω τρία διαλύματα:

- 1) 25 ml αποδιατακτικές ουσίες 50% + 100 μl APS + 10 μl TEMED
- 2) 25 ml αποδιατακτικές ουσίες 30% + 100 μl APS + 10 μl TEMED
- 3) 5 ml αποδιατακτικές ουσίες 0% + 50 μl APS + 5 μl TEMED

Στη συνέχεια τα διαλύματα 1 και 2 τοποθετούνται στην αντλία ανάμειξης των αποδιατακτικών διαλυμάτων η οποία συνδέεται με την κασέτα ηλεκτροφόρησης. Το διάλυμα (3) προστέθηκε 15 min μετά τα αντίστοιχα διαλύματα (1) και (2) ώστε να διαμορφωθούν τα κελιά για την φόρτωση των δειγμάτων.

2.3.4.2. Ανάλυση της κοινότητας των AOB με την μέθοδο DGGE

Για τη μοριακή ανάλυση της κοινότητας των AOB χρησιμοποιήθηκε πηκτή ακρυλαμίδης 8% με διαβάθμιση αποδιατακτικών ουσιών 45 και 62% που παρασκευάστηκαν όπως φαίνεται στο Πίνακα 15. Ο τελικός όγκος των διαλυμάτων ήταν 25ml.

Πίνακας 15. Οι όγκοι των διαλυμάτων αποδιατακτικών ουσιών που αναμίχθηκαν για την παρασκευή πηκτής ακρυλαμίδης 8% με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών 45 και 62%

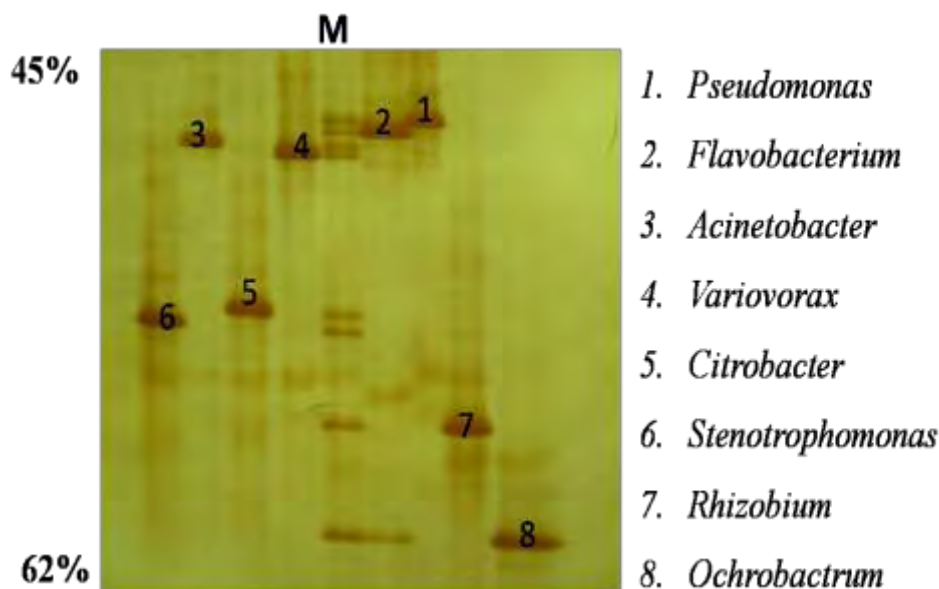
Συγκέντρωση Αποδιατακτικών Ουσιών	Διάλυμα 100 % (ml)	Διάλυμα 0% (ml)
45%	11.25	13.75
62%	15.5	9.5

Για κάθε πηκτή παρασκευάστηκαν τα παρακάτω τρία διαλύματα:

- 1) 25 ml αποδιατακτικές ουσίες 50% + 100 μl APS + 10 μl TEMED
- 2) 25 ml αποδιατακτικές ουσίες 30% + 100 μl APS + 10 μl TEMED
- 3) 5 ml αποδιατακτικές ουσίες 0% + 50 μl APS + 5 μl TEMED

Στη συνέχεια τα διαλύματα 1 και 2 τοποθετούνται στην αντλία ανάμειξης των αποδιατακτικών διαλυμάτων η οποία συνδέεται με την κασέτα ηλεκτροφόρησης. Το διάλυμα (3) προστέθηκε 15 min μετά τα αντίστοιχα διαλύματα (1) και (2) ώστε να διαμορφωθούν τα κελιά για την φόρτωση των δειγμάτων.

Στην περίπτωση των βακτηρίων χρησιμοποιήθηκε κατάλληλος marker που αποτελούνταν από μίγμα 16S rRNA PCR προϊόντων (συγκέντρωση 20 ng/μL) των βακτηρίων που ακολουθούν με σειρά εμφάνισης από πάνω προς τα κάτω: *Pseudomonas sp.*, *Flavobacterium sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Variovorax sp.*, *Citrobacter sp.*, *Stenotrophomonas sp.*, *Rhizobium sp.*, *Ochrobactrum sp.*



Εικόνα 8. DGGE Marker για βακτήρια: Εικόνα πηκτής πολυακρυλαμίδιου DGGE σε βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών 45-62%. Σε κάθε γραμμή της πηκτής φορτώθηκαν 1 μ l από το προϊόν της PCR εσωτερικής ένθεσης (εκκινητές 357f-GC και 534r) του 16S rRNA γονιδίου επιλεγμένων βακτηριακών στελεχών από την συλλογή του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. Το προϊόν ανάμιξης (Marker: M) περιέχει την ίδια συγκέντρωση (20 ng/ μ l) για όλα τα βακτήρια που αναλύθηκαν

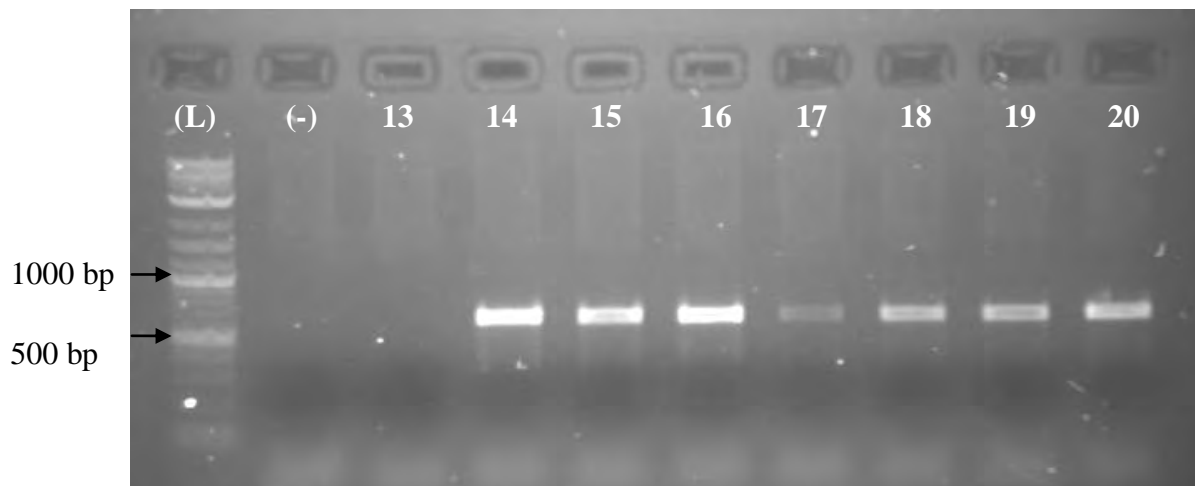
2.4. Στατιστική Ανάλυση

Οι εικόνες των πηκτωμάτων DGGE μετατράπηκαν σε δεδομένα δυαδικής μορφής (binary data), ανάλογα με την παρουσία ή απουσία ζωνών DNA στο μοριακό αποτύπωμα, με χρήση του ελεύθερου λογισμικού πακέτου CrossChecker (Wageningen, Netherlands). Στη συνέχεια, τα δεδομένα δυαδικής μορφής αναλύθηκαν με τη μέθοδο πολυμεταβλητότητας των Κύριων Συντεταγμένων (Principal Coordinates Analysis, PCoA) ώστε να αξιολογηθεί η επίδραση των διαφορετικών δόσεων του nicosulfuron και του χρόνου δειγματοληψίας (πείραμα αγρού) στη σύσταση της μικροβιακής κοινότητας των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών. Οι τιμές των δύο Κύριων Συντεταγμένων (PCo1 και PCo2) που περιελάμβαναν το μεγαλύτερο κομμάτι της παραλλακτικότητας ($> 50\%$) των δεδομένων, χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή διαγραμμάτων κατανομής (ordination) των δειγμάτων με βάση τις ανεξάρτητες μεταβλητές που στην προκειμένη περίπτωση ήταν οι χρόνοι δειγματοληψίας και τα διαφορετικά επίπεδα δόσεων του nicosulfuron. Στις περιπτώσεις όπου οι δύο κύριες Συντεταγμένες περιέγραφαν ποσοστό $< 50\%$ της παραλλακτικότητας των δεδομένων, οι έξι πρώτες συντεταγμένες που προέκυψαν από την ανάλυση των Κύριων Συντεταγμένων υποβλήθηκαν σε περαιτέρω Ανάλυση Κανονικών Μεταβλητών (Canonical Variate Analysis, CVA). Όλες οι παραπάνω στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το στατιστικό πακέτο Genstat 11.0v

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 PCR ενίσχυση του *amoA* γονιδίου των ΑΟΑ

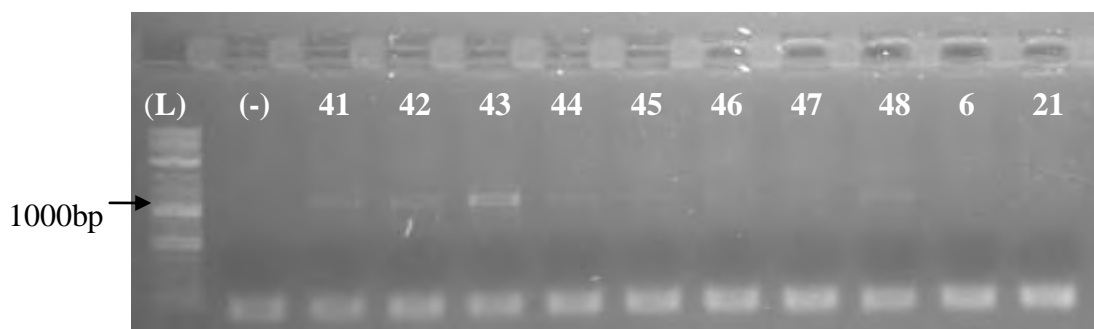
Από την ενίσχυση PCR του *amoA* γονιδίου των ΑΟΑ προέκυψαν προϊόντα του αναμενόμενου μεγέθους (635 bp) όπως παρουσιάζεται ενδεικτικά στην Εικόνα 6.



Εικόνα 9. Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης 1.2% προϊόντων που προέκυψαν από PCR ενίσχυση του γονιδίου *amoA* των ΑΟΑ του εδάφους. L: 1kb DNA Ladder, (-): αρνητικός μάρτυρας, 13-16 δείγματα μάρτυρας - 2 ημέρες, 17-20 δείγματα 1X - 2 ημέρες

3.2. PCR ενίσχυση του *16S rRNA* γονιδίου των ΑΟΒ

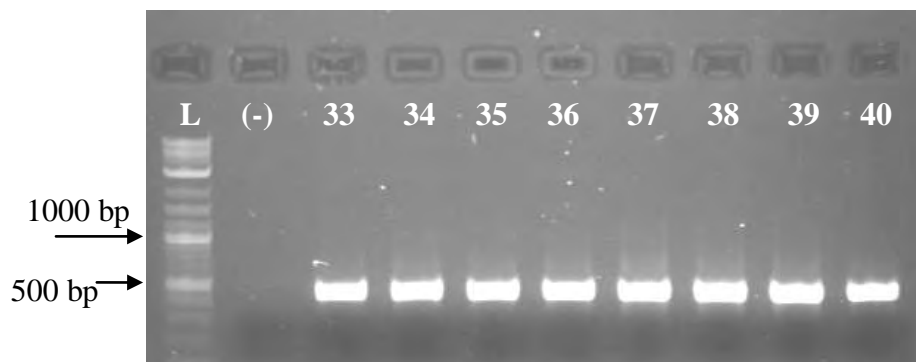
Για την ενίσχυση του *16S rRNA* γονιδίου των ΑΟΒ, πραγματοποιήθηκαν 3 διαδοχικές PCR αντιδράσεις. Στην πρώτη το εδαφικό DNA ενισχύθηκε με χρήση των εκκινητών *βAMOf* και *βAMOr* και το τελικό προϊόν της ενίσχυσης είχε μέγεθος 1100 bp.



Εικόνα 10. Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης 1 % των προϊόντων που προέκυψαν από PCR ενίσχυση του γονιδίου *16S rRNA* των ΑΟΒ του εδάφους με τους εκκινητές *βamof-βamor*. L: 1kb DNA Ladder, (-): αρνητικός μάρτυρας, 41-44: μεταχείριση 1X 116 ημέρες, 45-48: μεταχείριση 5X - 116 ημέρες, 6: μεταχείριση 1X - πριν την εφαρμογή, 21: μεταχείριση 5X - 2 ημέρες.

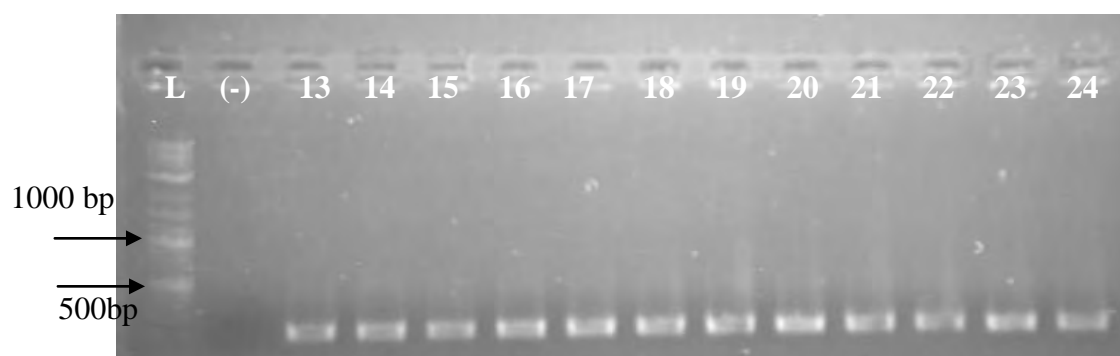
Στη συνέχεια το προϊόν των 1100 bp υποβλήθηκε σε νέα αντίδραση PCR με χρήση των εκκινητών *CTO189fABC* και *CTO654r*, για την ενίσχυση τμήματος της

αλληλουχίας του 16S rRNA των AOB. Το τελικό προϊόν της ενίσχυσης είχε μέγεθος 465 bp.



Εικόνα 11. Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης 1.2 % των προϊόντων που προέκυψαν από PCR εσωτερικής ένθεσης του γονιδίου 16S rRNA των AOB του εδάφους με τους εκκινητές CTO189f-CTO654r. L: ladder, (-): αρνητικός μάρτυρας, 33-36: μεταχείριση 5X - 28 ημέρες, 37-40: μεταχείριση μάρτυρας - 116 ημέρες

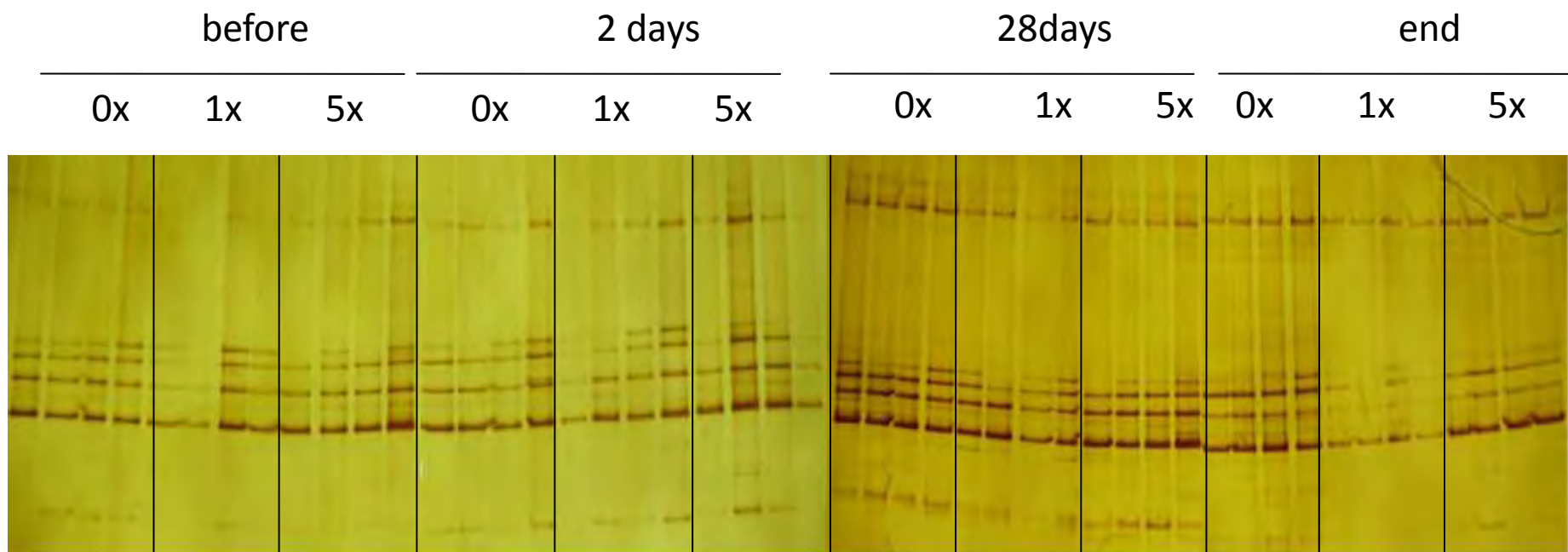
Τέλος, το προϊόν της 2^{ης} PCR (465 bp) υποβλήθηκε σε νέα PCR εσωτερικής ένθεσης με τους εκκινητές 357f+GC και 534r, προκειμένου να προκύψει προϊόν κατάλληλο (194 bp) για ανάλυση με τη μέθοδο DGGE.



Εικόνα 12. Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης 1.2% των προϊόντων που προέκυψαν από PCR εσωτερικής ένθεσης του γονιδίου 16S rRNA των AOB με τους εκκινητές 357f+GC-534r, L: ladder, (-): αρνητικός μάρτυρας, 13-16: μεταχείριση μάρτυρας - 2 ημέρες, 17-20: 1X - 2 ημέρες, 21-24: μεταχείριση 5X - 2 ημέρες)

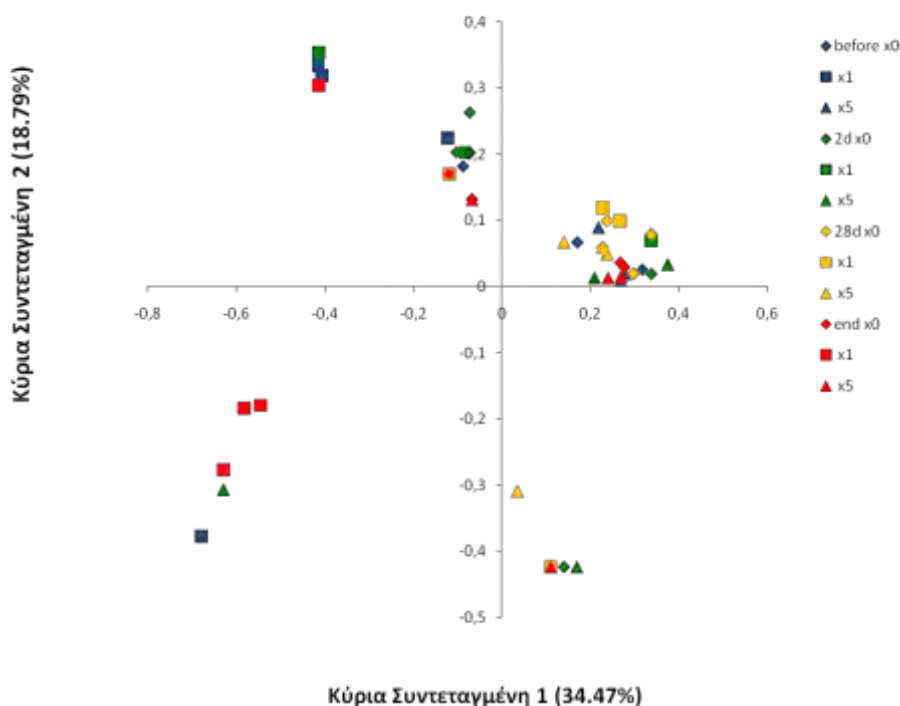
3.3. Μοριακή αποτύπωση της κοινότητας των AOA

Τα μοριακά αποτυπώματα της κοινότητας των AOA στις διάφορες ημέρες δειγματοληψίας παρουσιάζονται στην Εικόνα 13. Γενικότερα παρατηρήθηκε περιορισμένος αριθμός ζωνών (6-8 ανά μεταχείριση) και παρόμοια μοριακά αποτυπώματα στις διάφορες μεταχειρίσεις και χρόνους δειγματοληψίας.



Εικόνα 13. Μοριακό αποτύπωμα DGGE της κοινότητας των ΑΟΑ στα δείγματα εδάφους που συλλέχθηκαν κατά την διάρκεια του πειράματος αγρού από πειραματικά τεμάχια που δέχτηκαν διαφορετικές δόσεις του ζιζανιοκτόνου nicosulfuron (0X, 1X, 5X). Τα δείγματα συλλέχθηκαν (α) πριν την επέμβαση (before), (β) 2 ημέρες μετά την επέμβαση (2days), (γ) 28 ημέρες μετά την επέμβαση (28days) και (δ) στο τέλος της βλαστικής περιόδου (116 ημέρες μετά την επέμβαση) (end).

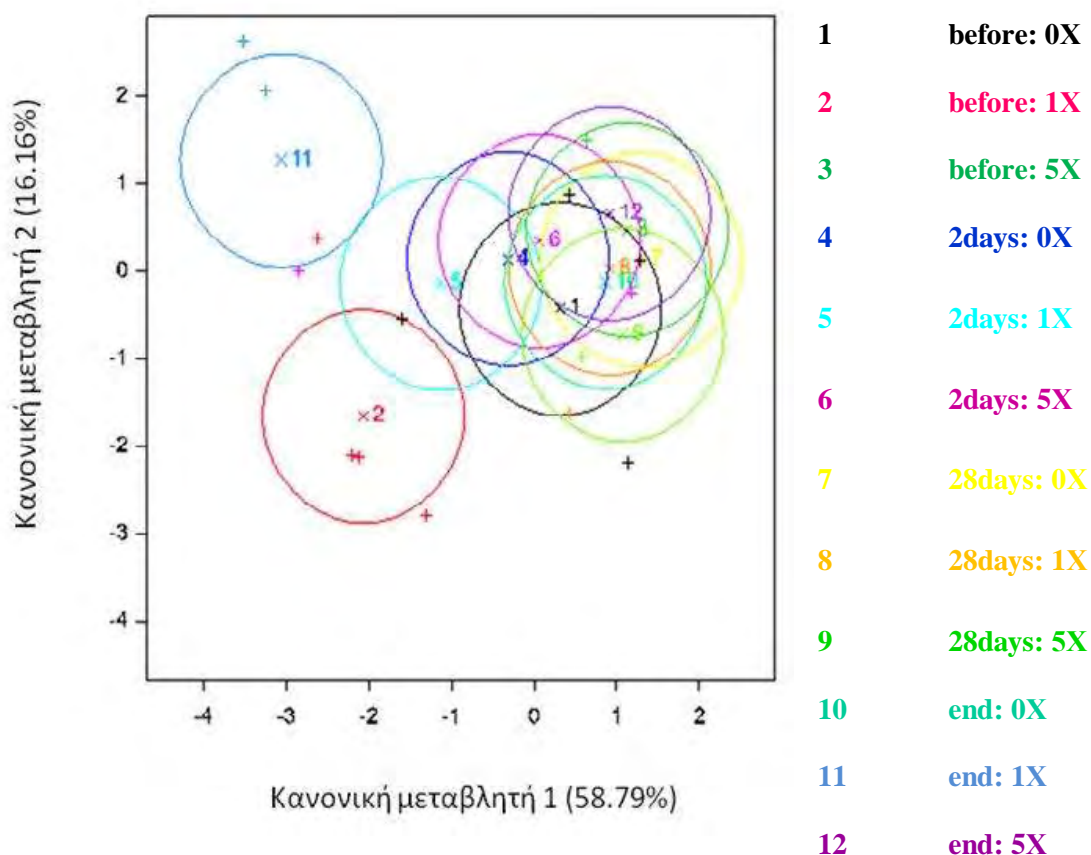
Ανάλυση των δεδομένων δυαδικής μορφής που προέκυψαν από την επεξεργασία των μοριακών αποτυπωμάτων με την μέθοδο των Κύριων Συντεταγμένων (Principal Coordinate Analysis, PCoA) δεν έδειξε καμία ομαδοποίηση στην κατανομή των δειγμάτων ως προς την δόση εφαρμογής του nicosulfuron ή τον χρόνο δειγματοληψίας (Διάγραμμα 1).



Διάγραμμα 1. Κατανομή των εδαφικών δειγμάτων στο πείραμα αγρού, σύμφωνα με την ανάλυση πολυμεταβλητότητας των Κύριων Συντεταγμένων. Οι δύο άξονες περιγράφουν το 34.5% (Κύρια Συντεταγμένη 1) και 18.8 % (Κύρια Συντεταγμένη 2) της συνολικής παραλλακτικότητας. Οι διάφοροι χρόνοι δειγματοληψίας απεικονίζονται ως εξής: μπλε: πριν την επέμβαση (before), πράσινο: 2 ημέρες μετά την επέμβαση (2days), πορτοκαλί: 28 ημέρες μετά την επέμβαση (28days), κόκκινο: τέλος πειράματος (end). Αντίστοιχα, τα διαφορετικά επίπεδα δόσεων απεικονίζονται ως εξής: ρόμβος: 0X, τετράγωνο: 1X, τρίγωνο: 5X.

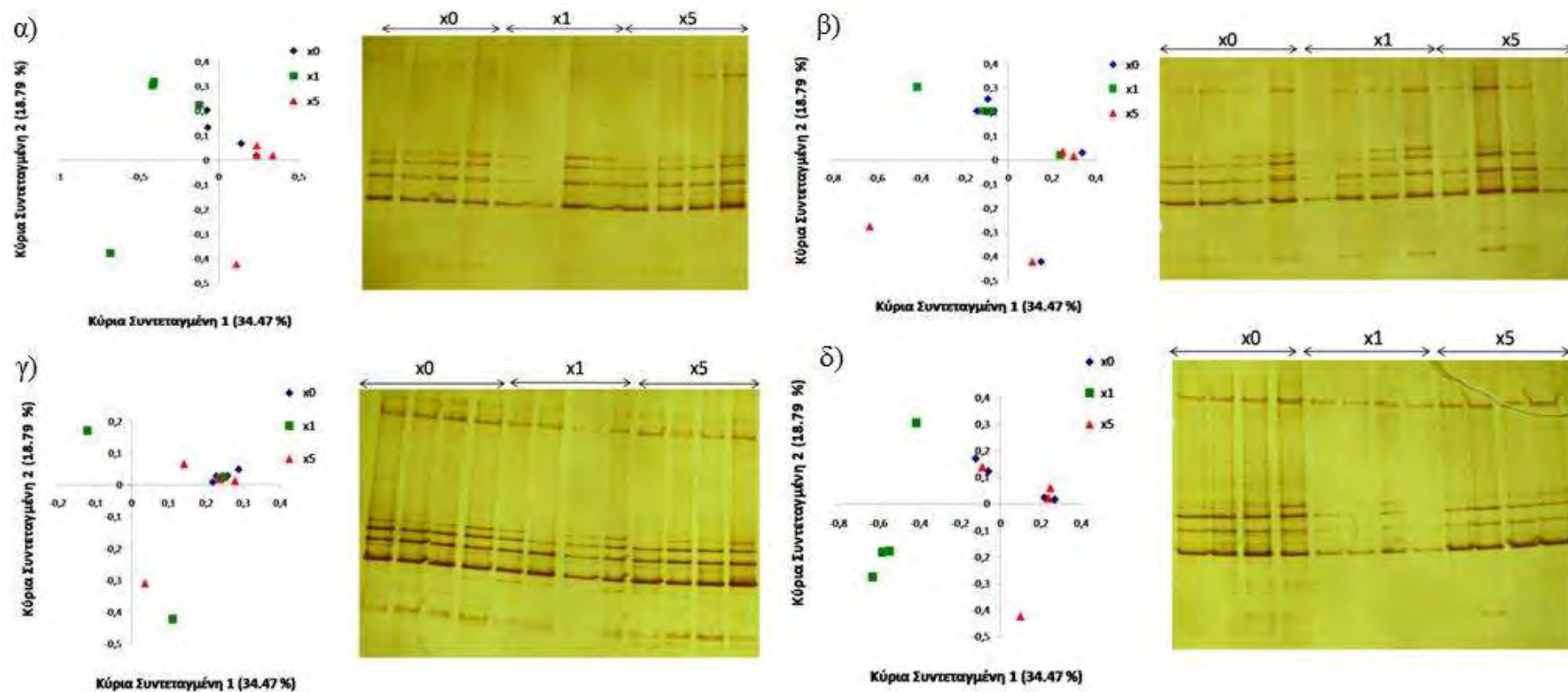
Παρόλο που οι δύο Κύριες Συντεταγμένες περιγράφουν συνολικά το 53.3% (PCo1: 34.4%, PCo2: 18.8%) της παραλλακτικότητας των δεδομένων, ήτοι σήμαινε πως δε θα απαιτούνταν περαιτέρω ανάλυση Κανονικών Μεταβλητών (CVA), εφαρμόστηκε και σε αυτή την περίπτωση ανάλυση Κανονικών Μεταβλητών (CVA). Από την CVA προέκυψε πως τα δείγματα δεν φαίνονται να διαφοροποιούνται ως προς την σύσταση της κοινότητας των AOA, ανεξαρτήτως δόσης εφαρμογής του nicosulfuron ή χρόνου δειγματοληψίας. Μοναδικές εξαιρέσεις αποτέλεσαν τα δείγματα που συλλέχθηκαν πριν από την εφαρμογή και στις 116 ημέρες μετά την εφαρμογή της συνιστώμενης δόσης του nicosulfuron (1X). Οι δύο Κανονικές

Μεταβλητές περιγράφουν το 74.9% (CV1: 58.8% και CV2: 16.2%) της συνολικής παραλλακτικότητας (Διάγραμμα 2).



Διάγραμμα 2. Κατανομή των δειγμάτων AOA εδάφους που συλλέχθηκαν από το πείραμα αγρού σύμφωνα με ανάλυση Κανονικών Μεταβλητών. Οι δύο άξονες περιγράφουν το 58.8 % (Κανονική Μεταβλητή 1) και 16.2 % (Κανονική Μεταβλητή 2) της συνολικής παραλλακτικότητας. Οι κύκλοι αποτελούν 95% όρια εμπιστοσύνης. Αλληλοεπικάλυψη μεταξύ των κύκλων παραπέμπει σε μη στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ μεταχειρίσεων.

Επίσης, εφαρμόστηκε ανάλυση σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας ώστε να εντοπιστούν πιθανές σημαντικές δοσο-εξαρτώμενες μεταβολές στη σύσταση της κοινότητας των AOA. Έτσι, η PCoA έδειξε α) μια προϋπάρχουσα παραλλακτικότητα μεταξύ των δειγμάτων από τα διάφορα πειραματικά τεμάχια πριν την εφαρμογή του nicosulfuron όπου τα δείγματα που συλλέχθηκαν από τα πειραματικά τεμάχια που θα δέχονταν τη συνιστώμενη δόση (1X) διαχωρίζονται από τα δείγματα που θα δέχονταν την υψηλότερη δόση (5X) (Διάγραμμα 3α), β) μη διαχωρισμό των δειγμάτων που συλλέχθηκαν στις 2 και στις 28 ημέρες μετά την εφαρμογή σε σχέση με τη δόση ζιζανιοκτόνου (Διάγραμμα 3β,γ) και γ) διαχωρισμό ανάμεσα των δειγμάτων που είχαν δεχτεί δόση nicosulfuron (1X) και δόσεις (0X και 5X), 116 ημέρες μετά την εφαρμογή του ζιζανιοκτόνου ως προς τη PCo1 (Διάγραμμα 3δ).

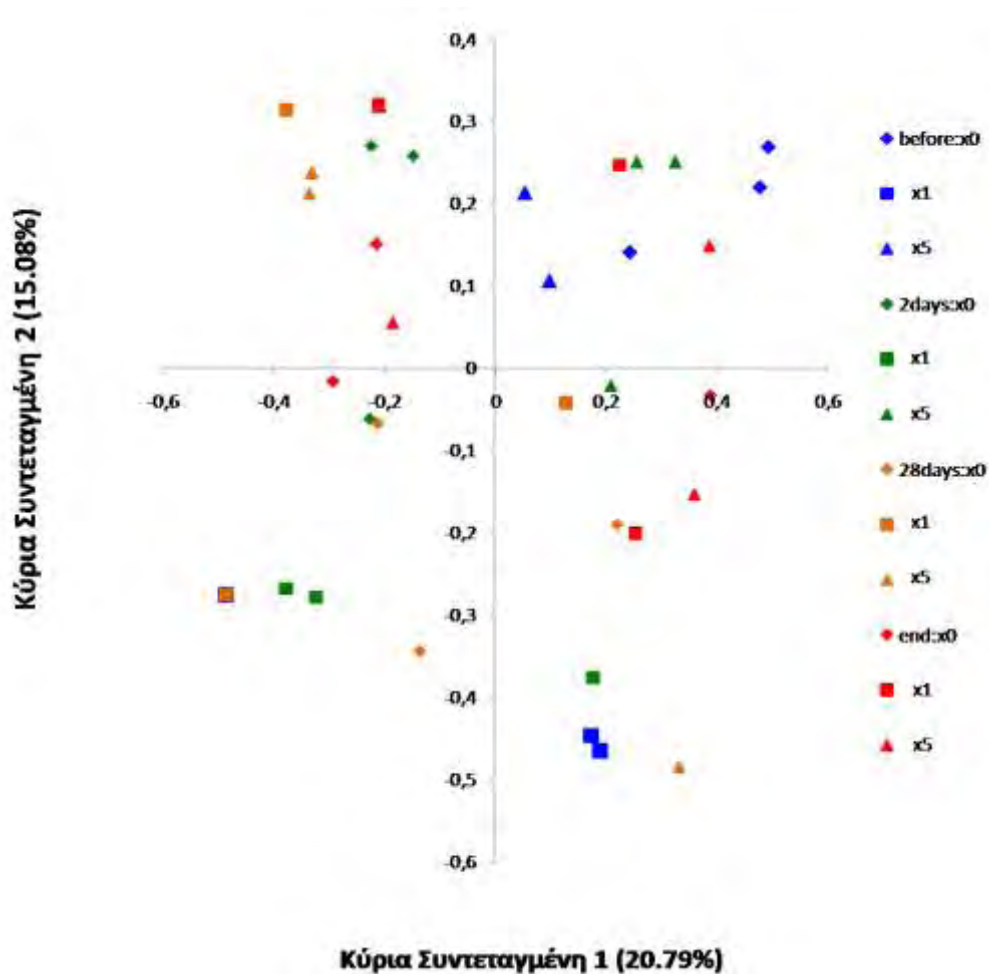


Διάγραμμα 3. Μοριακό αποτύπωμα DGGE της κοινότητας των AOA (δεξιά) και αντίστοιχη ανάλυση πολυμεταβλητότητας Κύριων Συντεταγμένων που προέκυψε από το μοριακό αποτύπωμα (αριστερά) για την αξιολόγηση της επίδρασης των διαφόρων δόσεων του nicosulfuron στην κοινότητα των AOA. Τα δεδομένα παρουσιάζονται για κάθε δειγματοληψία ξεχωριστά: (α) πριν την επέμβαση, (β) 2 ημέρες (γ) 28 ημέρες και (δ) 116 ημέρες μετά την επέμβαση. Τα διαφορετικά επίπεδα δόσεων απεικονίζονται ως εξής: 0X: μπλε ρόμβος, 1X: πράσινο τετράγωνο, 5X: κόκκινο τρίγωνο

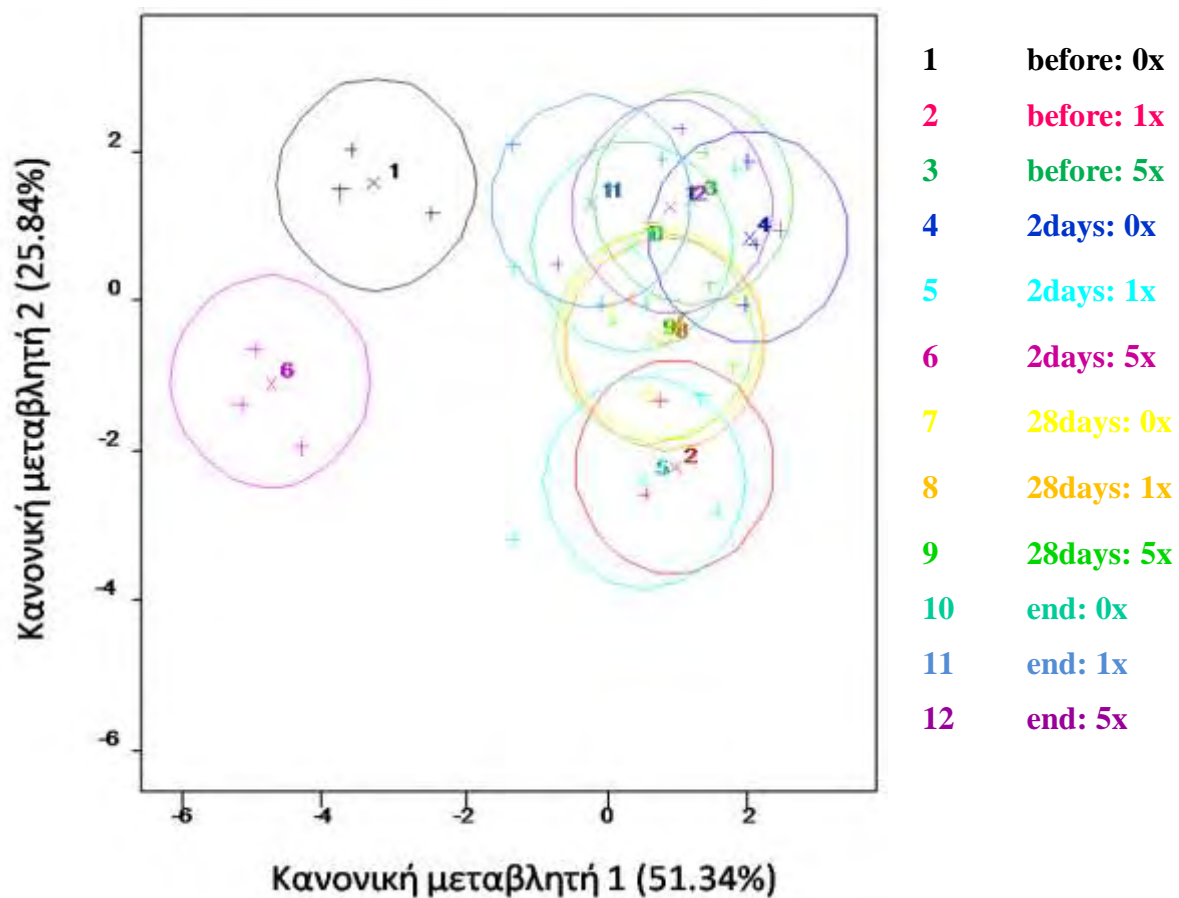
3.4. Μοριακή αποτύπωση της κοινότητας των AOB

Τα μοριακά αποτυπώματα της κοινότητας των AOB στις διάφορες ημέρες δειγματοληψίας παρουσιάζονται στην Εικόνα 14. Σε αντίθεση με τα AOA, εδώ παρατηρήθηκε υψηλή παραλλακτικότητα ακόμα και μεταξύ των επαναλήψεων της ίδιας μεταχείρισης. Συνολικά ανιχνεύτηκαν 8-12 ζώνες στις διάφορες μεταχειρίσεις. Από την Ανάλυση Κύριων Συντεταγμένων και την κατανομή των δειγμάτων στις δύο κύριες συντεταγμένες δεν προέκυψε ομαδοποίηση των δειγμάτων ούτε ως προς τη δόση εφαρμογής nicosulfuron ούτε ως προς το χρόνο δειγματοληψίας (Διάγραμμα 4). Δεδομένου ότι οι δύο Κύριες Συντεταγμένες PCo1 (20,79%) και PCo2 (15,08%) περιγράφουν μόνο το 35,9% (<50%) της συνολικής παραλλακτικότητας των δεδομένων εφαρμόστηκε ακόλουθη ανάλυση των δεδομένων που προέκυψαν από την PCoA με τη μέθοδο των Κανονικών Μεταβλητών από την οποία και πάλι δεν προέκυψε κάποιο πρότυπο επίδρασης του nicosulfuron ή του χρόνου δειγματοληψίας. Μοναδικές εξαιρέσεις αποτέλεσαν τα εδαφικά δείγματα που συλλέχθηκαν πριν την εφαρμογή του nicosulfuron από τα πειραματικά τεμάχια του μάρτυρα (0X) και τα δείγματα που συλλέχθηκαν 2 ημέρες μετά την εφαρμογή της δόσης 5X του nicosulfuron που διαχωρίστηκαν από όλες τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις ως προς τη CV1, αλλά και μεταξύ τους ως προς την CV2. Οι δύο Κανονικές Μεταβλητές 1 και 2 περιγράφουν συνολικά το 77,2% (CV1: 51,3%, CV2: 25,8%) της παραλλακτικότητας (Διάγραμμα 5).

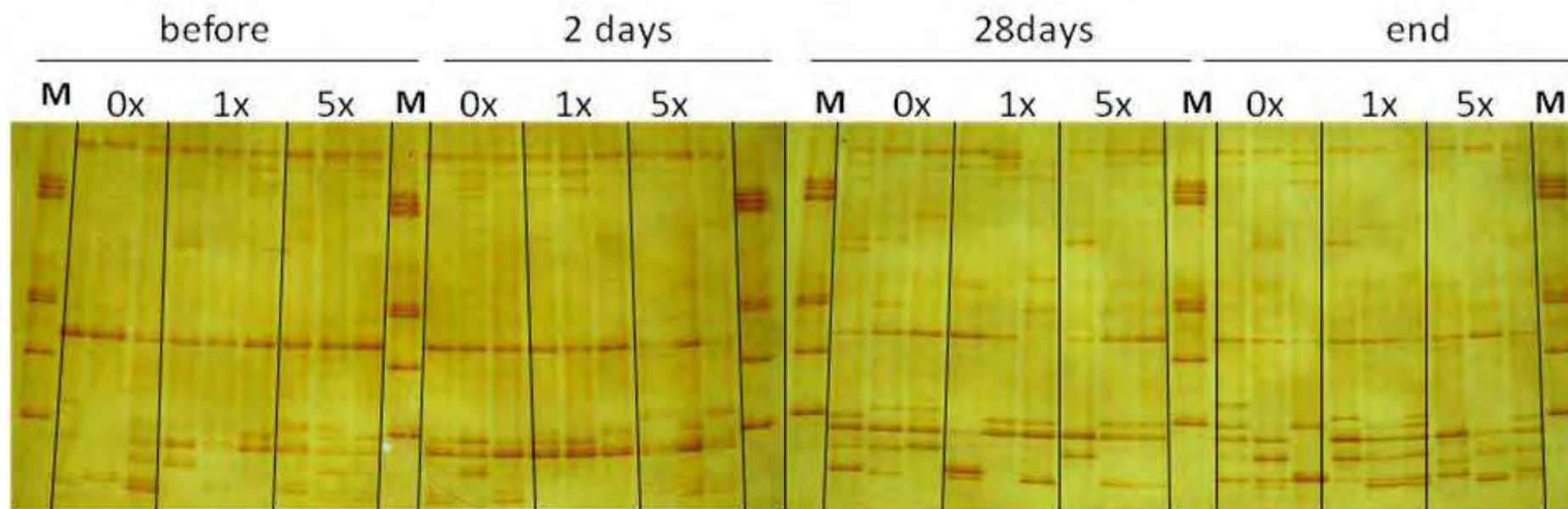
Επιπλέον ανάλυση εστίασε στην αναζήτηση πιθανών σημαντικών δοσο-εξαρτώμενων μεταβολών στην σύσταση της κοινότητας των AOB σε κάθε δειγματοληψία ξεχωριστά. Έτσι ανάλυση PCoA έδειξε ότι πριν την εφαρμογή του nicosulfuron, τα δείγματα εδάφους που πρόκειται να δεχτούν δόσεις 0X και 5X της συνιστώμενης, διαχωρίζονται από εκείνα της δόσης 1X ως προς την PCo2 (Διάγραμμα 6α). Δύο ημέρες μετά την επέμβαση παρατηρείται διαχωρισμός ως προς την PCo1 των δειγμάτων που δέχτηκαν εφαρμογή nicosulfuron σε δόσεις 0X και 1X της συνιστώμενης από εκείνα που δέχτηκαν εφαρμογή δόσης 5X (Διάγραμμα 6β). Αντίθετα, στους χρόνους δειγματοληψίας 28 ημέρες μετά την επέμβαση, αλλά και στο τέλος του πειράματος δεν φαίνεται να υπάρχει ξεκάθαρος διαχωρισμός των εδαφικών δειγμάτων σε σχέση με τη δόση εφαρμογής (Διάγραμμα 6γ,δ).



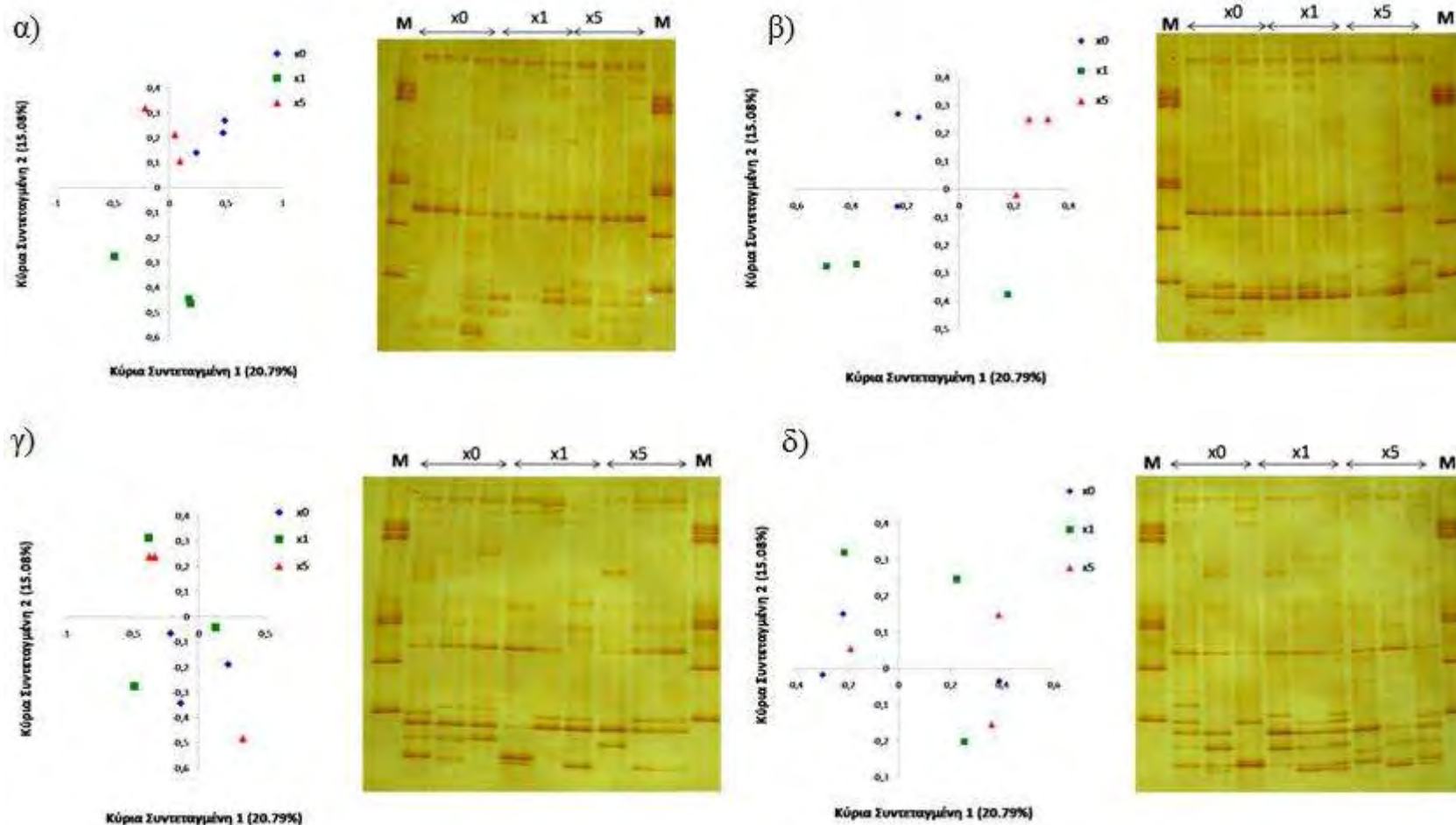
Διάγραμμα 4. Κατανομή των εδαφικών δειγμάτων σύμφωνα με ανάλυση πολυμεταβλητότητας Κύριων Συντεταγμένων. Οι δύο άξονες περιγράφουν το 20,8% (Κύρια Συντεταγμένη 1) και 15.1 % (Κύρια Συντεταγμένη 2) της συνολικής παραλλακτικότητας. Οι διάφοροι χρόνοι δειγματοληψίας απεικονίζονται ως εξής: μπλε: πριν την επέμβαση (before), πράσινο: 2 ημέρες μετά την επέμβαση (2days), πορτοκαλί: 28 ημέρες μετά την επέμβαση (28days), κόκκινο: τέλος πειράματος (end). Αντίστοιχα, τα διαφορετικά επίπεδα δόσεων απεικονίζονται ως εξής: ρόμβος: 0x, τετράγωνο: 1x, τρίγωνο: 5x.



Διάγραμμα 5. Κατανομή των δειγμάτων εδάφους από τις διάφορες μεταχειρίσεις στο πείραμα αγρού σύμφωνα με ανάλυση Κανονικών Μεταβλητών. Οι δύο άξονες περιγράφουν το 51.3 % (Κανονική Μεταβλητή 1) και 25.8 % (Κανονική Μεταβλητή 2) της συνολικής παραλλακτικότητας. Οι κύκλοι που περιβάλλουν τα δείγματα αποτελούν 95% όρια εμπιστοσύνης κάθε μεταχείρισης. Αλληλοεπικάλυψη μεταξύ των κύκλων καταδικνύει μη σημαντικές διαφορές μεταξύ μεταχειρίσεων



Εικόνα 14. Μοριακό αποτύπωμα DGGE της κοινότητας των AOB σε δείγματα εδάφους που συλλέχθηκαν από το πείραμα αγρού. Τα δείγματα δέχτηκαν εφαρμογή διαφορετικών δόσεων nicosulfuron (0X, 1X, 5X). Τα μοριακά αποτυπώματα παρουσιάζονται με βάση τον χρόνο συλλογής τους μετά την εφαρμογή του nicosulfuron: (α) πριν την επέμβαση (before), (β) 2 ημέρες μετά την επέμβαση (2days), (γ) 28 ημέρες μετά την επέμβαση (28days) και (δ) στο τέλος της βλαστικής περιόδου (116 ημέρες μετά την επέμβαση) (end). M: Marker για βακτήρια που αποτελείται από μίγμα 16S rRNA-PCR προϊόντων (συγκέντρωση 20 ng/μL) των βακτηρίων που ακολουθούν με σειρά εμφάνισης στην πηκτή από πάνω προς τα κάτω: *Pseudomonas sp.*, *Flavobacterium sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Variovorax sp.*, *Citrobacter sp.*, *Stenotrophomonas sp.*, *Rhizobium sp.*, *Ochrobactrum sp.* (αναλυτικά η σύσταση του Marker στην Εικόνα 8).



Διάγραμμα 6. Μοριακό αποτύπωμα DGGE της κοινότητας των AOB (δεξιά) και αντίστοιχη ανάλυση πολυμεταβλητότητας Κύριων Συντεταγμένων (Μέση τιμή ομάδας, n=3) που προέκυψε από το μοριακό αποτύπωμα (αριστερά) για την αξιολόγηση της επίδρασης των διαφορετικών δόσεων του nicosulfuron στην κοινότητα των AOB στο έδαφος. Τα δεδομένα παρουσιάζονται για κάθε δειγματοληψία ξεχωριστά: (α) πριν την επέμβαση, (β) 2 ημέρες μετά την επέμβαση, (γ) 28 ημέρες μετά την επέμβαση και (δ) στο τέλος της βλαστικής περιόδου (116 ημέρες μετά την επέμβαση). Τα διαφορετικά επίπεδα δόσεων απεικονίζονται ως εξής: 0x: μπλε ρόμβος, 1x: πράσινο τετράγωνο, 5x: κόκκινο τρίγωνο.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία εκτιμήθηκαν οι επιδράσεις του ευρέως χρησιμοποιούμενου ζιζανιοκτόνου nicosulfuron της ομάδας των σουλφονυλουριών στη δομή της κοινότητας των νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών του εδάφους σε επίπεδο αγρού. Ελάχιστες μελέτες έχουν αξιολογήσει την επίδραση εξωγενών καταπονήσεων συμπεριλαμβανομένων και των γεωργικών φαρμάκων στην κοινότητα των νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών σε επίπεδο αγρού που προσομοιάζει σε μεγάλο βαθμό την πραγματική έκθεση της μικροβιακής κοινότητας στα γεωργικά φάρμακα. Αν και αρκετοί ερευνητές έχουν μελετήσει την επίδραση της θερμοκρασίας (Avrahami et al., 2003), του pH (Nicol et al., 2008), της αλατότητας (Santoro et al., 2008) και των αζωτούχων λιπασμάτων (Shen et al., 2008) στη δομή και την αφθονία των AOB και των AOA, είναι αρκετά περιορισμένες οι μελέτες που έχουν διεξαχθεί για τη διερεύνηση της επίδρασης των γεωργικών φαρμάκων στις κοινότητες των AOB και AOA που αποτελούν ζωτικής σημασίας ομάδες μικροοργανισμών για την ομαλή λειτουργία του κύκλου του N. Επιπρόσθετα σήμερα δεν υπάρχουν αναφορές σχετικά με την επίδραση των σουλφονυλουριών και ειδικότερα του nicosulfuron, στη δομή και την αφθονία των νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών του εδάφους, τόσο σε επίπεδο αγρού όσο και σε επίπεδο μικροκόσμων. Η χρήση των νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών ως βιο-δείκτες εκτίμησης της ποιότητας του εδάφους και διερεύνησης της λειτουργίας του εδαφικού οικοσυστήματος έχει προταθεί πρόσφατα από διάφορους ερευνητές (Wessen and Halin 2011; Pereira e Silva et al., 2013).

Η επίδραση του ζιζανιοκτόνου nicosulfuron στη σύσταση της κοινότητας των νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών του εδάφους, εκτιμήθηκε με PCR-DGGE ανάλυση σε επίπεδο DNA. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε ενίσχυση (1) του 16S rRNA γονιδίου των AOB και (2) του *amoA* γονιδίου των AOA. Η διαφορετική αυτή προσέγγιση προέκυψε λόγω αδυναμίας παραλαβής, σταθερά και επαναλαμβανόμενα, προϊόντων ενίσχυσης του *amoA* γονιδίου των AOB, με εκκινητές τους *amo1f*+GC και *amo2R*. Ανάλογα προβλήματα με το συγκεκριμένο ζεύγος εκκινητών έχουν αναφερθεί και από άλλους ερευνητές που κατέληξαν πως η αδυναμία αυτή οφείλεται είτε στην παρουσία της πλούσιας σε ζεύγη γουανίνης-κυτοσίνης (GC clamp) αλληλουχίας στο 5' άκρο του *amo1f*+GC εκκινητή (Nicol et al., 2008), είτε στο χαμηλό ποσοστό των πληθυσμών των AOB στο έδαφος (Offre et al., 2009). Τα κύρια μειονεκτήματα του 16S rRNA γονιδίου ως μοριακού δείκτη είναι: (α) ότι δεν σχετίζεται απαραίτητα με τη φυσιολογία των οργανισμών στόχων και (β) η διεύρυνση του φάσματος των αλληλουχιών που ενισχύονται κατά την PCR

αντίδραση εξαιτίας της έλλειψης εξειδίκευσης που μπορεί να περιλάβει φυλογενετικά συγγενείς αλλά φυσιολογικά και οικολογικά διαφορετικούς οργανισμούς (Junier et al., 2010). Για το λόγο αυτό, στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος των CTO εκκινήτων (CTO189fABC και CTO654r) (Kowalchuk et al., 1997) το οποίο προορίζεται ειδικά και αποκλειστικά για την ενίσχυση των νιτρωδοποιητικών β-πρωτεοβακτηρίων που αποτελούν και την κυρίαρχη ομάδα AOB στο έδαφος. Η χρήση διαφορετικών γονιδιακών τόπων για την αξιολόγηση των μεταβολών στη σύσταση των AOB και AOA στην παρούσα εργασία δεν επέτρεψε την απευθείας σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ των δύο ομάδων νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών σε σχέση με την ευαισθησία τους στην έκθεση στο nicosulfuron.

Παρ όλα αυτά, σε γενικότερο επίπεδο δεν παρατηρήθηκαν δοσο-εξαρτώμενες μεταβολές στη δομή των μικροβιακών κοινοτήτων των νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών. Ωστόσο, σημειώνεται ότι το παρόν πείραμα αγρού αποτέλεσε ένα μόνο κομμάτι της αξιολόγησης της τοξικότητας του nicosulfuron στους νιτρωδοποιητικούς μικροοργανισμούς και συνοδεύτηκε από ανάλογο πείραμα που πραγματοποιήθηκε σε φυτοδοχεία σε ελεγχόμενες συνθήκες και με σημαντικά υψηλότερες δόσεις εφαρμογής του nicosulfuron που προκάλεσαν σημαντικές μεταβολές στην σύσταση της κοινότητας των νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών (Ε. Παπαδοπούλου Διδακτορική διατριβή 2013 υπό συγγραφή). Η μη παρατήρηση εκτεταμένων μεταβολών στην κοινότητα των AOB και AOA στο πείραμα αγρού σε σχέση με το πείραμα μικροκόσμων (που σύντομα αναφέρθηκε παραπάνω) μπορεί να αποδοθεί 1) στα σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα δόσεων που αξιολογήθηκαν στον αγρό και 2) στην μια εφαρμογή του ζιζανιοκτόνου κατά την διάρκεια του πειράματος αγρού (σύμφωνα με την γεωργική πρακτική) σε σχέση με τις επαναλαμβανόμενες εφαρμογές που πραγματοποιήθηκαν στο πείραμα μικροκόσμων. Μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν στη βιβλιογραφία μελέτες που να έχουν εξετάσει την επίδραση γεωργικών φαρμάκων στη δομή των νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών του εδάφους με πειράματα αγρού και ως εκ τούτου δεν είναι δυνατόν να προβούμε σε ανάλογες συγκρίσεις. Εντούτοις, τα αποτελέσματα έδειξαν πως χορήγηση του nicosulfuron στην συνιστώμενη δόση ή ακόμα και 5 φορές πολλαπλάσια της, δεν φαίνεται να προκαλεί σημαντικές μεταβολές στην κοινότητα των AOB και AOA.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alavanja Michael, Hoppin Jane, Kamel Freya . (2004). Health Effects of Chronic Pesticide Exposure: Cancer and Neurotoxicity. *Annual Review of Public Health*(25), 155-197.
- Arp DJ, Chain PSG, Klotz Mg. (2007). The impact of genome analyses on our understanding of ammonia-oxidizing bacteria. *Ann Rev Microbiol*, 61, 503-528.
- Auguet J., Barberan A., Casamayor E.O. (2010). Global ecological patterns in uncultured Archaea. *ISME*, 4, 182-190.
- Avrhami, S., Conrad, R. (2003) Patterns of community change among ammonia oxidizers in meadow soils upon long-term incubation at different temperatures. *Appl Environ Microb* **69**: 6152–6164.
- Benachour Nora, Séralini Gilles-Eric. (2008). Glyphosate Formulations Induce Apoptosis and Necrosis in Human Umbilical, Embryonic, and Placental Cells. *Chemical Research in Toxicology*(22), 97-105.
- Bothe H., Jost G., Schlöter M., Ward B.B., Witzel K-P. (2000). Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. *FEMS Microbiol Rev*, 24, 673-690.
- Brochier-Armanet C., Boussau B., Gribaldo S., Forterre P. (2008). Mesophilic Crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nat. Rev. Microbiol*, 6, 245-252.
- Burton SAQ, Prosser JI, s, . (2001). Autotrophic ammonia oxidation at low pH through urea hydrolysis. *Appl Environ Microbiol*, 67, 2952–2957.
- Caffrey J.M., Bano N., Kalanetra K., Hollibaugh J.T. . (2007). Ammonia oxidation and ammonia-oxidizing bacteria and archaea from estuaries with differing histories of hypoxia. *ISME J.* , 1, 660–662.
- Capone DG, Knapp AN . (2007). Oceanography: a marine nitrogen cycle fix. *Nature*, 445, 159-160.
- Carriger, J.F., Rand, G.M., Gardinali, P.R., Perry, W.B., Tompkins, M.S., Fernandez, A. M. (2006). Pesticides of potential ecological concern in sediment from South Florida Canals: An ecological risk prioritization for aquatic arthropods. *Soil Sed. Contam*(15), 21-45.
- Chain P., Lamerdin J., Larimer F. (2003). Complete genome sequence of the ammonia oxidizing bacterium and obligate chemolithoautotroph *Nitrosomonas europaea*. *J Bacteriol*, 185, 2759–2773.
- Chang Yun-Juan, Hussain Anwar, Stephen John, Mullen Mike, White David. (2001). Impact of herbicides on the abundance and structure of indigenous β -subgroup ammonia-oxidizer communities in soil microcosms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(11), 2462-2468.
- Chanika Eleni, Georgiadou Dafne, Soueref Eftehia, Karas Panagiotis, Karanasios Evangelos, Tsiropoulos Nikolaos , Tzortzakakis Emmanuel, Karpouzas Dimitrios. (2010). Isolation of soil bacteria able to hydrolyze both organophosphate and carbamate pesticides. *Bioresource Technology*, 102, 3184-3192.
- Chen S.K., Edwards C.A. . (2001). A microcosm approach to assess the effects of fungicides on soil ecological processes and plant growth: Comparison of two soil types,. *Soil Biol Biochem*, 33, 1981-1991.
- Crouzet O., Wiszniewski J., Donnadieu F., Bonnemoy F., Bohatier J., Mallet C. (2013). Dose-dependent effects of the herbicide mesotrione on soil cyanobacterial communities. *Arch Environ Contam Toxicol*, 64(1), 23-31.

- Crouzet Olivier, Batisson Isabelle, Besse-Hoggan Pascale, Bonnemoy Frederique, Bardot Corinne, Poly Franck, Bohatier Jacques, Mallet Clarisse . (2010). Response of soil microbial communities to the herbicide mesotrione: A dose-effect microcosm approach. *Soil Biology & Biochemistry*, 42, 193-202.
- Dailey F.E., Cronan JE Jr. (1986). Acetohydroxyacid synthase I, a required enzyme for isoleucine and valine biosynthesis in *Escherichia coli* K-12 during growth on acetate as the sole carbon source. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 165(2), 453-460.
- de la Torre J.R., Walker C.B., Angalls A.E., Konneke M., Stahl D.A. (2008). Cultivation of a thermophilic ammonia-oxidizing archaeon synthesizing crenarchaeol. *Environ. Microbiol.*, 10, 810-818.
- DeLong E.F. (1992). Archaea in coastal marine environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 5685-5689.
- DeLong E.F. (1998). Everything in moderation: archaea as 'non-extremophiles'. *Curr. Opin. Genet. Dev*, 8, 649-654.
- Di H., Cameron K., Shen J., Winefield C., O'Callagan M., Bowatte S., He J. (2010). Ammonia-oxidizing bacteria and archaea grow under contrasting soil nitrogen conditions . *FEMS Microbiol. Ecol*, 64, 167-174.
- Duce R.A., LaRoche J., Altieri K., Arrigo K.R., Baker A.R., Capone D.G. et al. (2008). Impacts of atmospheric anthropogenic nitrogen on the open ocean. *Science*, 320, 893-897.
- Fenoll José, Hellín Pilar, Flores Pilar, Martínez Carmen María ,Navarro Simón . (2012). Photocatalytic degradation of five sulfonylurea herbicides in aqueous semiconductor suspensions under natural sunlight. *Chemosphere*(87), 954-961.
- Food and Agriculture Organization of United Nations. (2002). International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides.
- Galloway J.N., Townsend A.R., Erisman J.W., Bekunda M., Cai Z.C., Freney J.R. (2008). Transformation of nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions. *Science*, 320, 889-892.
- Gieseke A, Tarre S, Green M, de Beer D . (2006). Nitrification in a biofilm at low pH values: role of in situ microenvironments and acid tolerance,. *Appl Environ Microbiol* , 72, 4283-4292.
- Gruber N., Galloway J.N. (2008). An earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature*, 451, 293-296.
- Haney R.L., Senseman S.A., Hons F.M., Zuberer D.A. (2000). Effect of glyphosate on soil microbial activity and biomass. *Weed Sci*, 48, 89-93.
- Hao Zhang, Wenhui Mu, Zhiguang Hou, Xian Wu, Weiwei Zhao, Xianghui Zhang, Hongyu Pan, Shihong Zhang. (2012). Biodegradation of nicosulfuron by the bacterium *Serratia marcescens* N80. *Journal of Environmental Science and Health*(47), 153–160.
- Harris S., Jones D.B. (1997). Optimisation of the polymerase chain reaction. *Biomed Sci*(54), 166-173.
- Hatzenpichler R., Lebedeva E.V., Spieck E., Stoecker K., Richter A., Daims H., Wagner M. (2008). A moderately thermophilic ammonia-oxidizing crenarchaeote from a hot spring. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 2364-2374.
- Hatzenpichler Roland . (2012). Diversity, Physiology, and Niche Differentiation of Ammonia-Oxidizing Archaea. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(21), 7501–7510.

- He J., Shen J., Zhang L., Zhu Y., Zheng Y., Xu M., Di H. (2007). Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea of a Chinese upland red soil under long term fertilization practises. *Environ. Microbiol*, 62, 242-257.
- Head I.M., Hiorns W.D., Embley T.M., McCarthy A.J., Saunders J.R. (1993). The phylogeny of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria as determined by analysis of 16S ribosomal RNA gene sequences. *J Gen Microbiol*, 139, 1147-1153.
- Hirayama H., Takai K., Inagaki F., Yamato Y., Suzuki M., Nealson K.H., Horikoshi K. . (2005). Bacterial community shift along a subsurface geothermal water stream in a Japanese gold mine. . *Extremophiles*, 9, 169-184.
- Hooper A.B., Vannelli T., Bergmann D.J., Arciero D.M. (1997). Enzymology of the oxidation of ammonia to nitrite by bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 71, 59-69.
- Ingalls A.E., Shah S.R., Hansman R.L., Aluwihare L.I., Santos G.M., Druffel E.R.M., Pearson A. . (2006). Quantifying archaeal community autotrophy in the mesopelagic ocean using natural radiocarbon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 103, 6442–6447.
- Ingram C.W., Coyne M.S., Williams D.W. (2005). Ingram CW, Coyne MS, Williams DW, Effects of commercial diazinon and imidacloprid on microbial urease activity in soil, . *J Environ Qual*, 34, 1573–1580.
- Jetten MSM . (2001). New pathways for ammonia conversion in soil and aquatic systems. *Plant and Soil*(230), 9-19.
- Jia Z.J., Conrad R. (2009). Bacteria rather than Archaea dominate microbial ammonia oxidation in an agricultural soil. *Environ Microbiol*, 11, 1658-1671.
- Jiang H., Dong H., Yu B., Lv G., Deng S., Berzins N., Dai M. . (2009). Diversity and abundance of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in Qinghai Lake, northwestern China. . *Geomicrobiology J*, 26, 199–211.
- Johnsen K, Jacobsen CS, Torsvik V. (2001). Pesticides effects on bacterial diversity in agricultural soil. A review. *Biol. Fertil. Soils* , 33, 443-453.
- Junier P., Kim O.S., Hadas O., Imhoff J.F., Witzel K.P. (2008). Evaluation of PCR primer selectivity and phylogenetic specificity by using amplification of 16S rRNA genes from betaproteobacterial ammonia-oxidizing bacteria in environmental samples. *Appl Environ Microbiol*, 74, 5231-5236.
- Junier Pilar, Molina Verónica, Dorador Cristina, Hadas Ora, Kim Ok-Sun, Junier Thomas, Witze Karl-Paul, Imhoff Johannes. (2010). Phylogenetic and functional marker genes to study ammonia-oxidizing microorganisms (AOM) in the environment. *Appl Microbiol Biotechnol*, 85, 425-440.
- Juretschko S., Timmermann G., Schmid M., Schleifer K.H., Pommerening-Röser A., Koops H.P., Wagner M. (1998). Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: Nitrosococcus mobilis and Nitrospira-like bacteria as dominant populations. *Appl Environ Microbiol*, 64, 3042-3051.
- Klotz M.G., Arp D.J., Chain P.S. (2006). Complete genome sequence of the marine, chemolithoautotrophic, ammonia-oxidizing bacterium Nitrosococcus oceanus ATCC 19707 . *Appl Environ Microbiol*, 72, 6299–6315.
- Klotz M.G., Stein L.Y. (2008). Nitrifier genomics and evolution of the nitrogen cycle. *FEMS Microbiol Lett*, 278, 146-156.
- Knutson, R. (1999). *Economic Impact of Reduced Pesticide Use in the United States*. Agricultural and Food Policy Center, Texas A&M University.

- Koenneke M., Bernhard A. E., de la Torre J. R., Walker C.B., Waterbury J.B., Stahl D.A. (2005). Isolation of autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature*(436), 543-546.
- Koops HP, Purkhold U, Pommerening-Roser A, Timmerman G, Wagner M. (2006). the lithoautotrophic ammonia-oxidizing bacteria. In: Dworkin M, Falkow S (eds). *The Prokaryotes*. Springer Verlag: New York, 778-811.
- Kowalchuk, G.A., Stephen, J.R, De Boer, W., Prosser, J.I, Embley, T.M., Woldendorp, J.W. (1997) Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Appl Environ Microbiol* **63**:1489–1497.
- Kowalchuk G.A., Stephen J.R. (2001). Ammonia oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology. *Annual Review of Microbiology*, *55*, 485-529.
- Lebedeva EV, Alawi M, Fiencke C, Namsaraev B, Bock E, Spieck E. (2005). Moderately thermophilic nitrifying bacteria from a hot spring of the Baikal rift zone. *FEMS Microbiol Ecol*, *54*, 297–306.
- Lee Kathleen, Townsend Jeffrey, Tepperman James, Black Margaret, Chuil C.F., Mazur Barbara, Dunsmuir Pamela, Bedbrook John. (1988). The molecular basis of sulfonyleurea herbicide resistance. *The EMBO Journal*, *7*(5), 1241 - 1248.
- Leininger S., Urich T., Schloter M., Schwark L., Qi J., Nicol G.W., Prosser J.I., Schuster S.C., Schleper C. (2006). Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature*, *442*, 806-809.
- Lorenz Alyson, Prapamonto Tippawanl, Narksen Warangkana, Srinual Niphan . (2012). Pilot Study of Pesticide Knowledge, Attitudes, and Practices. *International Journal of Environmental Research and Public Health*(9), 3365-3383.
- McAuliffe Laura, Ellis Richard J, Lawes Jo R, Ayling Roger D, Nicholas Robin AJ. (2005). 16S rDNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis; a single generic test for detecting and differentiating Mycoplasma species. *Journal of Medical Microbiology*(54), 731-739.
- McCaig A.E., Embley T.M., Prosser J.I. (1994). Molecular analysis of enrichment cultures of marine ammonia oxidiser. *FEMS Microbiol Lett*, *120*, 363-367.
- McCourt Jennifer, Pang Siew Siew, King-Scott Jack, Guddat Luke, Duggleby Ronald. (2006). Herbicide-binding sites revealed in the structure of plant acetohydroxyacid synthase. *PNAS*, *103*(3), 569–573.
- McLaughlin Alison , Mineau Pierre. (1995). The impact of agriculture practises on biodiversity. *Agriculture, Ecosystem & Environment*(55), 201-212.
- Muyzer R.M., Maniatis T, Lerman LS. (1987). Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods Enzymology*(555), 501-527.
- Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* *59*:695–700
- Nicol G.W., Schleper C. (2006). Ammonia-oxidising Crenarchaeota: important players in the nitrogen cycle? *Trends Microbiol.*, *14*, 207-212.
- Nicol GW, Leininger S, Schleper C, Prosser JI, . (2008). The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. *Environ Microbiol*, *10*, 2966–2978.

- Niewiadomska A. (2004). Effect of carbendazim, imazetapir and thiram on nitrogenase activity, the number of microorganisms in soil and yield of red clover (*Trifolium pratense* L.). *Pol J Environ Stud*, 13, 403-410.
- Noris, K. (2008). Agriculture and biodiversity conservation: opportunity knocks. *Conservation Letters*, 2-11.
- Norton J.M., Klotz M.G., Stein L.Y. (2008). Complete genome sequence of *Nitrosospora multififormis*, an ammonia-oxidizing bacterium from the soil environment. *Appl Environ Microbiol*, 74, 3559-3572.
- O'Mullan GD, Ward BB. (2005). Relationship of temporal and spatial variabilities of ammonia oxidizing bacteria to nitrification rates in Monterey Bay, California. *Appl Environ Microbiol*, 71, 697-705.
- Offre P., Prosser J.I., Nicol G.W. (2009). Growth of ammonia-oxidizing archaea in soil microcosms is inhibited by acetylene. *FEMS Microbiol Ecol*, 70, 99-108.
- Pampulha, M. E., Oliveira A. . (2006). Impact of an herbicide combination of bromoxynil and prosulfuron on soil microorganisms. *Curr. Microbiol.*, 53, 238-243.
- Penton C.R., Devol A.H., Tiedje J.M. (2006). Molecular evidence for the broad distribution of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in freshwater and marine sediments. *Appl Environ Microbiol*, 72, 6829-6832.
- Postgate, J. R. (1982). The Fundamentals of Nitrogen Fixation. New York, NY: Cambridge University Press.
- Pereira e Silva, M.C., Semenov, A.V. Schmitt, H., van Elsas, J.D., Salles, J.F. (2013) Microbe-mediated processes as indicators to establish the normal operating range of soil functioning. *Soil Biol Biochem* (in press, <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.10.002>).
- Pratscher Jennifer, Dumont Marc, Conrad Ralf. (2011). Ammonia oxidation coupled to CO₂ fixation by archaea and bacteria in an agricultural soil. *PNAS*, 108(10), 4170-4175.
- Primentel David. (1995). Amounts of pesticides reaching target pests: Environmental impacts and ethics. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*, 8, 17-29.
- Purkhold U., Wagner M., Timmermann G., Pommerening-Röser A., Koops H.P. (2003). A 16S rRNA and amoA-based phylogeny of 12 novel betaproteobacterial ammonia-oxidizing isolates: extension of the dataset and proposal of a new lineage within the nitrosomonads. *Int J Syst Evol Microbiol*, 53, 1485-1494.
- Reigstad L.J., Richter A., Daims H., Urich T., Schwark L., Schleper C. (2008). Nitrification in terrestrial hot springs of Iceland and Kamchatka. *FEMS Microbiol. Ecol*, 64, 167-174.
- Saiki K.R., Gelfand H.D., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn T.G., Mullis K.B., Erlich A.H. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*(239), 487-491.
- Saiki K.R., Scharf S., Faloona F., Mullis K. B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N. (1985). Enzymatic amplification of globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*(230), 1350- 1354.
- Saitoh K., Kuroda T., Kumano S. (2001). Effects of organic fertilization and pesticide application on growth and yield of field-grown rice [*Oryza sativa*] for 10 years. *Japanese Journal of Crop Science*, 70(4), 530-540.
- Santoro, A.E., Francis, C.A., De Sieyes, N.R., Boehm, A.B. (2008) Shifts in the relative abundance of ammonia-oxidizing bacteria and archaea across

- physicochemical gradients in a subterranean estuary. *Environ Microbiol* **10**: 1068–1079.
- Sayavedra-Soto L.A., Hommes N.G., Arp D.J. . (1994). Characterization of the gene encoding hydroxylamine oxidoreductase in *Nitrosomonas europaea*. *J. Bacteriol*, *176*, 504-510.
- Schleper C., Jurgens G., Jönascheit M. . (2005). Genomic studies of uncultivated archaea . *Nat. Rev. Microbiol*, *3*, 478-488.
- Schleper Christa, N. G. (2010). Ammonia- Oxidising Archaea - Physiology, Ecology and Evolution . *Advances in Microbial Physiology*, *57*.
- Spang A., Hatzenpichler R., Brochier-Armanet C., Rattei T., Tischler P., Spieck E., Streit W., Stahl D.A., Wagner M., Schleper C. (2010). Distinct gene set in two different lineages of ammonia-oxidizing archaea supports the phylum Thaumarchaeota. *Trends Microbiol.*, *18*, 331-340.
- Stein L.Y., Arp D.J., Berube P.M. . (2007). Whole-genome analysis of the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas eutropha* C91: implications for niche adaptation. *Environ Microbiol*, *9*, 2993-3007.
- Tamegai H., Aoki R., Arakawa S., Kato C. . (2007). Molecular analysis of the nitrogen cycle in deep-sea microorganisms from the Nankai Trough: genes for nitrification and denitrification from deep-sea environmental DNA. *Extremophiles* , *11*, 269–275.
- Teske A., Alm E., Regan J.M., Toze S., Rittmann B.E., Stahl D.A. . (1994). Evolutionary relationships among ammonia- and nitrite- oxidizing bacteria. *J Bacteriol* , *176*, 269-275.
- Tourna M., Freitag T.E., Nicol G.W., Prosser J.I. (2008). Growth, activity and temperature responses of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in soil microcosms. *Environ Microbiol*, *10*, 1357-1364.
- Treusch AH, Leininger S, Kletzin A, Schuster SC, Klenk H-P, Schleper C. (2005). Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic chrenarcheota in nitrogen cycling. *Environ Microbiol*, *7*, 1985-1995.
- Venter J.C, Remington K, Heidelberg J.F., Halpern A.L., Rusch D., Eisen J.A., Wu D., Paulsen I., Nelson K.E., Nelson W., Fouts D.E., Levy S., Knap A.H., Lomas M.W., Nealson K., White O., Peterson J., Hoffman J., Parsons R., Baden-Tillson H., Pfannkoch C. . (2004). Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, *304*, 66-74.
- Vitousek P.M. . (1997). Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences. *Ecological Applications*(7), 737-750.
- Voytek M.A., Ward B.B. (1995). Detection of ammonium-oxidizing bacteria of the beta-subclass of the class Proteobacteria in aquatic samples with the PCR. *Appl Environ Microbiol*, *61*, 1444–1450.
- Wang M.C., Gong M., Zang H.B., Hua X.M., Yao J., Pang Y.J., Yang Y.H. (2006). Effect of methamidophos and urea application on microbial communities in soil as determined by microbial biomass and community level physiological profiles, *J Environ Sci Health B* *41* (2006), 399–4. *J Environ Sci Health B*, *41*, 399-413.
- Ward B.B., O'Mullan G.D. (2002). Worldwide Distribution of *Nitrosococcus oceanus*, a Marine Ammonia-Oxidizing gamma-Proteobacterium, Detected by PCR and Sequencing of 16S rRNA and amoA Genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, *68*, 4153-4157.

- Wardle D.A., Nicholson K.S., Rahman A. (1994). Influence of herbicide applications on the decomposition, microbial biomass, and microbial activity of pasture shoot and root litter. *NZ J. Agric. Res.*, 37, 29-39.
- Wessen, E., Hallin, S. (2011) Abundance of archaeal and bacterial ammonia oxidizers – Possible bioindicator for soil monitoring. *Ecol Indic* 11:1696-1698.
- Wickramasinghe S, Borin M, Kotagama SW, Cochard R, Anceno AJ. (2009). Multi functional pollution mitigation in a rehabilitated mangrove conservation area. *Ecol Eng*, 35, 898-907.
- Woese C.R. (1987). Bacterial Evolution. *Microbiol Rev*, 51, 221-271.
- Wu Qiong, Chen Xiaoxu, Xu Yanjun, Han Lijun. (2010). Dissipation and Residues of Nicosulfuron in Corn and Soil. *Bull Environ Contam Toxicol*, 82, 79-82.
- Wuchter C., Abbas B., Coolen M.J.L., Herfort L., van Bleijswijk J., Timmers P., Strous M., Teira E., Herndl G.J., Middelburg J.J., Schouten S., Damste J.S.S. (2006). Archaeal nitrification in the ocean. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 12317–12322.
- Xia Weiwei, Zhang Caixia, Zeng Xiawoey, Feng Youzhi, Weng Jiahua, Lin Xiangui, Zhu Jianguo, Xiong Zhengqin, Xu Jian, Cai Zukong, Jia Zhongjun. (2011). Autotrophic growth of nitrifying community in an agricultural soil. *The ISME journal*, 5, 1226-1236.
- Zhang Huiwen, Li Xinyu, Wu Minna, Su Zencheng, Zhang Chenggang. (2008). Impact of acetochlor on ammonia-oxidizing bacteria in microcosm soils. *Journal of Environmental Sciences*, 20, 1126-1131.
- Zhang L.M., Offre P.R., He J.Z., Verhamme D.T., Nicol G.W., Prosser J.I. (2010). Autotrophic ammonia oxidation by soil thaumarchaea. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107, 17240-17245.
- Zhou Y., Liu W., and Ye H. (2006). Effects of pesticides metolachlor and S-metolachlor on soil microorganisms in aquisols. II. Soil respiration. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao*, 17, 1305-1309.
- Ελευθεροχωρινός, Η. Γ. (2008). *Ζιζανιολογία*. Αθήνα: ΑγροΤύπος.
- Ζίφα Α., Μαμούρης Ζ., Μούτου Κ. (2008). Βιολογία. Στο *Βιολογία* (σσ. κεφ. 12: 990-993). Βόλος: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας.